

CYP3A-fenotype hos leddgiktpasienter i relasjon til inflammasjonsstatus og behandling med biologiske DMARDs

Birgit Malene Tovik Wollmann



Masteroppgave i farmakologi ved
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

CYP3A-fenotype hos leddgiktpasienter i relasjon til inflammasjonsstatus og behandling med biologiske DMARDs

Masteroppgave i farmakologi for graden *Master i farmasi* ved
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,
Universitetet i Oslo

Oppgaven ble utført ved Senter for Psykofarmakologi
Diakonhjemmet Sykehus, Oslo

Veiledere:

Professor II Espen Molden

Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus
Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Stipendiat Caroline Gjestad

Senter for Psykofarmakologi,
Diakonhjemmet Sykehus

© Birgit Malene Tovik Wollmann

2015

CYP3A-fenotype hos leddgiktpasienter i relasjon til inflammasjonsstatus og behandling med biologiske DMARDs

Birgit Malene Tovik Wollmann

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min hovedveileder Espen Molden. Takk for god veiledning og nyttige innspill både før og under skriveprosessen. En spesiell takk til Caroline Gjestad og Kristine Hole for god hjelp med serumkonsentrasjonsanalysene og godt samarbeid under arbeidet med oppgaven.

Jeg vil også takke alle ansatte ved Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus, for et flott år. Det har vært veldig hyggelig og utrolig lærerikt å være sammen med dere.

Jeg vil takke kollega Kristine Heitmann, som har delt kontor med meg dette året, og Ane Wenstad Haug for et flott samarbeid, og for mange faglige og muntre diskusjoner. Tusen takk for et veldig hyggelig år.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for all interesse og god støtte gjennom hele studietiden.

Blindern, 15. mai 2015

Birgit Malene Tovik Wollmann

Forkortelser

4β-OH-K	4β-hydroksykolesterol
4β-OH-K-d ₇	4β-hydroksykolesterol-d ₇ (deuterert internstandard)
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
AUC	arealet under tids-plasmakonsentrasjonskurven
bDMARDs	biologiske sykdomsmodifiserende antirevmatiske legemidler (eng. biological disease-modifying antirheumatic drugs)
CRP	C-reaktivt protein
CYP	cytokrom P-450
IL	interleukin
IL-1-RI	interleukin-1 type I-reseptor
IL-1Ra	interleukin-1-reseptorantagonist
INF	interferon
LC-MS/MS	væskeskromatografi med tandem massespektrometrisk deteksjon
LLOQ	laveste kvantifiseringsgrense (eng. lower limit of quantification)
RA	revmatoid artritt
SFP	Senter for Psykofarmakologi
SR	senkningsreaksjon
TDM	terapeutisk legemiddelmonitorering (eng. therapeutic drug monitoring)
TNF	tumor nekrose faktor
UPLC	ultra performance liquid chromatography

Sammendrag

Bakgrunn: Enzymer tilhørende cytokrom P-450 3A (CYP3A)-subfamilien er de viktigste i metabolisme av legemidler. Systemisk inflammasjon er foreslått som en faktor til den store interindividuelle variabiliteten i CYP3A-fenotype, og 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) er en aktuell biomarkør for denne variasjonen. Hensikten med dette masterprosjektet var å undersøke om CYP3A-fenotype, målt som serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K, i) endres etter oppstart med biologiske DMARDs (disease-modifying antirheumatic drugs/ sykdomsmodifiserende antirevmatiske legemidler, bDMARDs) hos leddgiktspasienter, og ii) skiller seg mellom leddgiktspasienter og personer uten kjent revmatisk sykdom. Sekundært skulle det også undersøkes i hvilken grad 4 β -OH-K korrelerer med inflammasjonsstatus, målt som CRP og senkningsreaksjon (SR), før og etter oppstart med bDMARDs.

Metode: Masterprosjektet tok utgangspunkt i registerstudien NOR-DMARD koordinert av Revmatologisk avdeling, Diakonhjemmet Sykehus. I alt 59 pasienter behandlet med bDMARDs i ca. 3 måneder mot revmatoid artritt (RA) og 52 levetiracetam-behandlede pasienter uten kjent revmatisk sykdom ble inkludert i prosjektet. Serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K ble bestemt ved bruk av en validert UPLC-APCI-MS/MS-metode ved Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus. Nivåer av 4 β -OH-K og inflammasjonsmarkører (CRP og SR), før og etter oppstart med bDMARDs, ble sammenlignet ved parrede, ikke-parametriske, tester («Wilcoxon»). En ikke-parametrisk, uparret test («Mann-Whitney») ble brukt for sammenligning av 4 β -OH-K-konsentrasjoner mellom antatt friske og RA-pasienter, og Spearmans' signed rank test ble benyttet i korrelasjonsanalysene mellom 4 β -OH-K, CRP og SR.

Resultater: Median CRP og SR var redusert, henholdsvis fra 6 til 2 mg/L ($p=0.07$) og fra 23 til 14 mm/h ($p<0.002$) etter behandling med bDMARDs. 4 β -OH-K-nivåene i RA-pasientene var ikke signifikant ulike etter bDMARD-behandling (median 50.0 vs. 51.6 nmol/L, $p=0.91$), men mediannivåene av 4 β -OH-K var signifikant lavere enn i personer uten kjent revmatisk sykdom (median 67.7 nmol/L) ved begge tidspunktene ($p<0.01$). Det var ingen korrelasjon mellom CRP eller SR og 4 β -OH-K-nivåer før behandling med bDMARDs ($p>0.3$), men etter 3 måneders bDMARD-behandling ble det observert signifikant korrelasjon ($p<0.01$, Spearman r -0.40 (CRP) og -0.34 (SR)).

Konklusjon: Denne studien indikerer at CYP3A-fenotype er redusert med ca. 20-30 % i RA-pasienter sammenlignet med pasienter uten inflammatorisk sykdom. Behandling med bDMARDs forbedrer ikke CYP3A-fenotype i løpet av 3 måneder, men CYP3A-fenotype er negativt korrelert med nivå av inflammasjonsmarkører etter oppstart med bDMARDs.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
1.1	Variasjon i legemiddelrespons.....	1
1.2	Metabolisme av legemidler.....	1
1.2.1	Kilder til farmakologisk variasjon.....	2
1.3	Cytokrom P-450-systemet.....	3
1.3.1	CYP3A.....	4
1.4	Inflammasjon og legemiddelmetabolisme.....	5
1.4.1	Revmatoid artritt.....	7
1.4.2	bDMARDs.....	9
1.5	Biomarkører for legemiddelmetaboliserende enzymer.....	11
1.5.1	4 β -hydroksykolesterol.....	12
1.6	Hensikt	14
2	Metode.....	15
2.1	Materiale.....	15
2.2	Serumkonsentrasjonsanalyser.....	15
2.2.1	Prøveopparbeidelse	16
2.2.2	UPLC-APCI-MS/MS-analyse	16
2.3	Målvariabler	18
2.4	Statistiske analyser.....	18
2.5	Etikk og godkjenninger	19
3	Resultater.....	20
3.1	Datamateriale.....	20
3.2	Inflammasjonsmarkører	21
3.3	4 β -hydroksykolesterol.....	23
4	Diskusjon.....	28
5	Konklusjon.....	33
	Litteraturliste	34

1 Introduksjon

1.1 Variasjon i legemiddelrespons

Forskjeller i legemiddelrespons mellom individer medfører store utfordringer i legemiddelbehandlingen av pasienter. Til tross for at interindividuell og intraindividuell variabilitet er velkjent som kompliserende faktorer i legemiddelbehandling, blir pasienter ofte forskrevet samme dose (1, 2). Dette medfører at en behandling som er effektiv og godt tolerert hos noen, kan føre til ineffektiv legemiddelbehandling, bivirkninger eller toksiske effekter hos andre. Det er anslått at 5-10 % av alle sykehusinnleggelser skyldes legemiddelbivirkninger (3, 4). Videre vil bivirkninger kunne medføre dødsfall, sykemeldinger og store kostnader for samfunnet, samt plager i hverdagen for den enkelte legemiddelbruker (5).

Forståelse av faktorene som fører til interindividuell variabilitet i legemiddelrespons vil kunne gjøre det enklere å identifisere individer som vil respondere, individer som ikke vil respondere og individer som har økt risiko for å få alvorlige bivirkninger. Slik vil legemiddelbehandling potensielt kunne bli mer effektiv og tryggere.

1.2 Metabolisme av legemidler

Individuelle forskjeller i legemiddelmetabolisme er av betydning for variabilitet i legemiddelrespons. Menneskets evne til å metabolisere og utskille legemidler er en del av kroppens forsvar mot potensielt skadelige fremmedstoffer, både naturlige og kjemiske, herunder for eksempel legemidler (6). Hydrofile legemidler kan utskilles uforandret i urinen via nyrene. De aller fleste legemidler er imidlertid hydrofobe for at de lettere skal kunne passere lipofile cellemembraner og nå virkestedet. For å hindre akkumulering og toksisitet omdannes mange legemidler derfor til mer hydrofile metabolitter, som sekundært elimineres via ytterligere metabolisme eller direkte utskillelse i urin eller galle (7).

Enzymsystemene som er involvert i metabolismen av legemidler er i all hovedsak lokalisert i leveren, men det forekommer også metabolisme av legemidler i andre vev, som i nyrene, lungene, plasma og tarmveggen (8). Legemidler kan metaboliseres i to trinn, og de vanligste kjemiske reaksjonene er oksidasjon, reduksjon, hydrolyse, og konjugeringsreaksjoner. Da oksidasjon-, reduksjon- og hydrolysereaksjoner ofte skjer først, etterfulgt av

konjugeringsreaksjoner (for eksempel glukuronidering) klassifiseres de som henholdsvis fase I- og fase II-reaksjoner (9). Metabolisme av legemidler fører vanligvis til dannelsen av inaktive metabolitter, men fase II-reaksjonene fører i tillegg til dannelsen av mer hydrofile metabolitter med økt molekylvekt, og fremmer slik eliminasjonen av legemidlet (6).

1.2.1 Kilder til farmakologisk variasjon

På veien fra inntak av dose til klinisk respons kan både farmakokinetisk variasjon i form av variasjon i absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon, og farmakodynamisk variasjon med variabilitet i reseptorinteraksjon og reseptorsensitivitet bidra til de observerte forskjellene i farmakologisk respons (1, 2). Faktorer som genetikk, miljø og sykdom påvirker legemidlers farmakokinetikk og -dynamikk, og har slik stor betydning for observert interindividuell variasjon (10).

Grunnet stor variasjon i ekspresjon og aktivitet av de viktigste legemiddelmetaboliserende enzymer og transportørene anses farmakokinetisk variasjon som en viktig kilde til forskjeller i klinisk respons mellom individer. Farmakokinetisk variasjon kan enkelt beskrives gjennom konsentrasjonsmålinger av legemidlet.

Farmakokinetisk variabilitet mellom individer medfører at serumkonsentrasjonen av et legemiddel er et bedre mål på effekt enn dosen som er gitt. Terapeutisk legemiddelmonitorering (eng. therapeutic drug monitoring, TDM) brukes for å justere for farmakokinetisk variasjon og kontrollere etterlevelse, og gir mulighet for mer individuell dosering (11). Sammen med farmakogenetiske analyser kan serumkonsentrasjonsmålinger bidra til mer individtilpasset legemiddelbehandling.

I tillegg til genetikk er alder, kjønn, vekt, livsstil (røyking og diett), komorbiditet, interaksjoner med andre legemidler eller naturmidler og etterlevelse viktige ikke-genetiske faktorer som kan medvirke til interindividuell og intraindividuell variasjon i legemiddelrespons (2).

1.3 Cytokrom P-450-systemet

Cytokrom P-450 (CYP)-systemet er en fellesbetegnelse på en superfamilie med de viktigste enzymene involvert i metabolismen av mange endogene og eksogene stoffer (12). Det er anslått at CYP-enzymet utfører 80 % av all fase I-metabolisme av klinisk brukte legemidler (10, 13). CYP-systemet er den mest studerte legemiddelmetaboliserende enzymgruppen, og det er i dag identifisert 57 funksjonelle gener som koder for ulike humane isoenzymer (6, 10). Basert på homologi i aminosyresekvens er enzymene gruppert i flere familier og subfamilier. Navnsettingen av enzymene er basert på forstavelsen CYP etterfulgt av et tall som angir familie, en bokstav som angir subfamilie og til slutt et tall som angir det enkelte enzym (6).

CYP-enzymene befinner seg i høyest konsentrasjon i leveren, men er også uttrykt i tarm, lunger, nyrer og sentralnervesystemet (CNS). Inne i cellene er enzymene lokalisert i endoplasmatisk retikulum (ER) (6). Enzymene har kapasitet til å metabolisere mange strukturelt ulike forbindelser. Flere av CYP-enzymene er viktige for biosyntese og degradering av endogene stoffer, som for eksempel syntesen av steroidhormoner og metabolisme av gallesyre (10, 14). Primært er det 15 enzymer fra CYP-familiene CYP1, CYP2 og CYP3 som er involvert i metabolismen av legemidler (6). Flere CYP-isoformer kan ha samme legemiddel som substrat, men enzymenes effektivitet kan variere (6, 14).

Det er stor variasjon i CYP-enzymenes ekspresjon og metabolske aktivitet. Aktiviteten til enzymene bestemmes både av genetiske og ikke-genetiske faktorer. Gener som eksisterer i flere varianter på grunn av evolusjonære mutasjoner blir kalt polymorfe.

Enkeltnukleotidpolymorfismer (eng. single nucleotide polymorphisms, SNPs), dvs. innsetninger eller delesjoner i gener, kan føre til redusert eller fullstendig fravær av enzymaktivitet av både fase I- og fase II-enzymet. Multiplikasjon av gener og medfølgende økt enzymaktivitet kan også oppstå (1). Genetisk polymorfisme henviser til genetiske varianter av gener som forekommer med en frekvens på minst 1 % i en populasjon (15). Mens det for CYP1A2 og CYP3A4 ikke er identifisert klinisk signifikante genetiske varianter er CYP2C9, CYP2C19 og CYP2D6 eksempler på tre viktige legemiddelmetaboliserende enzymer som er polymorft uttrykt (16).

Aktiviteten til CYP-enzymene kan variere mye, og det er ikke uvanlig med 10-20 gangers variasjon i enzymaktivitet mellom individer (16). Dette forklarer mye av den

interindividuelle variasjonen man ser ved å gi samme dose av et legemiddel til forskjellige individer.

1.3.1 CYP3A

CYP3A-subfamilien er ansett som den viktigste i metabolisme av legemidler, både på grunn av at enzymene i denne undergruppen er høyt uttrykt i både tarm og lever, og at de har mange legemidler som substrater (10). CYP3A-enzymene anslås å være ansvarlig for metabolismen av over 50 % av alle legemidlene på markedet i dag (12). Isoenzymene som er karakterisert er CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43. CYP3A4 og CYP3A5 har størst betydning i forhold til legemiddelmetabolisme, og CYP3A43 og CYP3A7 spiller en mindre rolle da de henholdsvis har svært lav aktivitet og primært er uttrykt i fostre og ikke i voksne (10).

CYP3A4 er det CYP-enzymet som er kvantitativt mest uttrykt i lever og tynntarm, hvor enzymet utgjør henholdsvis 30 % og 80 % av totalt enzymuttrykk (12, 17). Aktiviteten til og ekspresjonen av CYP3A-enzymene kan variere mye mellom individer, og variasjonen kan tilskrives en kombinasjon av genetiske faktorer og miljøfaktorer. For *CYP3A4*-genet er det identifisert over 40 ulike variantalleler, men ingen av mutasjonene er hittil forbundet med stor klinisk betydning (18, 19). Unntaket er noen allelvarianter, for eksempel *CYP3A4**22, som er assosiert med lavere metaboliserende kapasitet, men på grunn av relativt sjelden forekomst har de foreløpig begrenset klinisk relevans (19). Miljøfaktorer som inflammasjon, hormonnivå, og ikke minst interaksjoner med andre legemidler gjennom hemming og induksjon av enzymet, kan ha stor betydning for intraindividuell variasjon i CYP3A4s ekspresjon og biologiske aktivitet (14). Molekylære og farmakologiske studier har vist at transkripsjonell aktivisering av CYP3A4 reguleres av kjernereseptoren pregnan X reseptor (PXR), men også av konstitutiv androstan reseptor (CAR). Ekspresjonen av CYP3A4 reguleres ved at PXR assosieres til retinoid X reseptor- α (RXR α) og heterodimeren PXR-RXR α bindes til kjernereseptorresponselementer i regulerende deler av genene (20).

CYP3A5 har stor sekvenshomologi (83 %) med CYP3A4 (14). For CYP3A5 er imidlertid genotype sterkt avgjørende for fenotype. Individer som bærer minst ett *CYP3A5**1-allel uttrykker CYP3A5, mens bærere av *CYP3A5**3, den vanligste allelvarianten, har fravær av funksjonelt CYP3A5 (21). Det er estimert at omtrent 20 % av kaukasiere uttrykker CYP3A5

(21). Eksempler på ulike CYP3A4/5-substrater, -hemmere og -indusere er angitt i tabell 1.1 (22).

Tabell 1.1 Eksempler på CYP3A4/5-substrater, -hemmere og -indusere.

Substrater	Hemmere	Indusere
Midazolam	Erytromycin	Karbamazepin
Simvastatin	Ketokonazol	Rifampicin
Ciklosporin	Ritonavir	Fenobarbital
Erytromycin (ikke CYP3A5)	Grapefruktjuice	Johannesurt

1.4 Inflammasjon og legemiddelmetabolisme

Inflammasjon er en del av en kompleks biologisk respons mot potensielt skadelig stimuli, som sammen med immunrespons, aktiveres ved en rekke traumer og sykdomstilstander (23). Mange ulike sykdommer, fra bakterie- og virusinfeksjoner til autoimmun sykdom og kreft, ledsages av inflammasjon og immunologisk respons (24). Inflammasjon kan klassifiseres som enten akutt eller kronisk.

C-reaktivt protein (CRP) og senkningsreaksjon (SR) har blitt brukt i over 80 år som mål på inflammasjon ved ulike sykdommer (25). CRP er et akutfaseprotein som hovedsakelig syntetiseres i lever og er et direkte mål på inflammasjon. Sekresjon av CRP stimuleres av proinflammatoriske cytokiner, særlig interleukin-6 (IL-6) (24). SR reflekterer det generelle nivået av akutfaseproteiner i blodet, og er et indirekte mål på inflammasjon. CRP-konsentrasjonen i plasma er normalt mindre enn ca. 4 mg/L, ofte mindre enn 1 mg/L, men kan stige til «flere hundre» mg/L i løpet av ett til to døgn etter eksponering for inflammatorisk stimuli (24). Normale verdier for SR varierer i ulike kilder, men verdier mellom 1-20 mm/h oppgis de fleste steder (24). Normalverdiene er høyere hos kvinner enn hos menn, og hos eldre personer sammenlignet med yngre (24). Det er ofte god korrelasjon mellom CRP og SR, men ikke alltid på grunn av CRPs generelt korte halveringstid sammenlignet med akutfaseproteinene som reflekteres av SR. SR vil være normal tidlig ved en inflammatorisk sykdom, mens CRP stiger fort, og SR vil respondere langsomt på endringer i en sykdomsprosess, mens CRP-konsentrasjonen synker raskt ved normalisering av tilstanden.

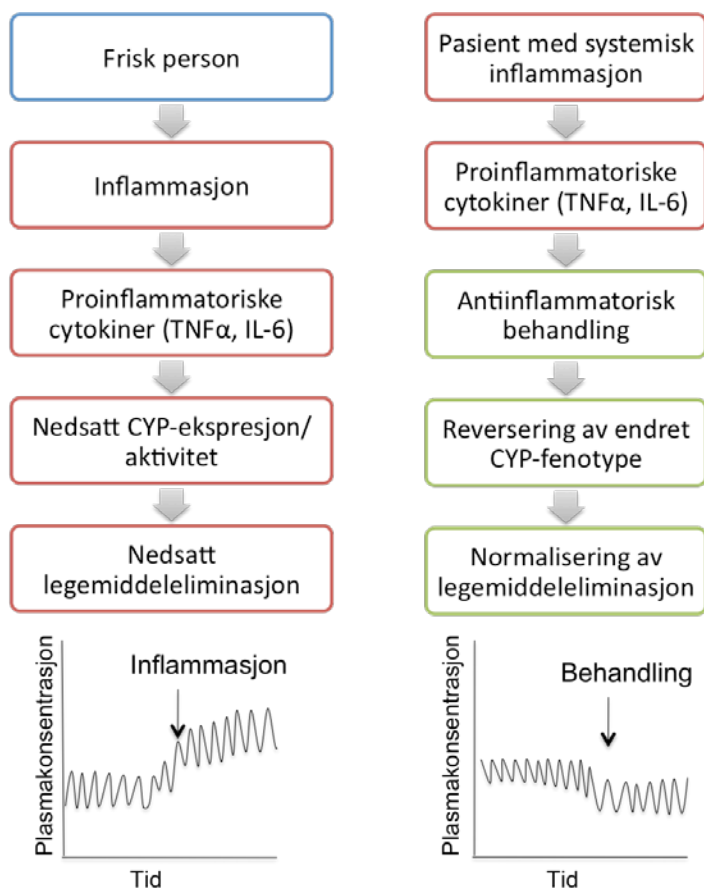
Det har vært rapportert at systemisk inflammasjon ved akutt eller kronisk inflammatorisk sykdom kan nedregulere aktivitet og uttrykk av CYP-enzymmer og legemiddeltransportører (26-28). Den første rapporten om endret farmakokinetikk ved infeksjon stammer fra 1978, og omhandler barn med øvre luftveisinfeksjon som ble behandlet med teofyllin mot astma (29). Det ble rapportert om en signifikant økning i halveringstiden til teofyllin i forbindelse med infeksjon. Flere kliniske studier har rapportert at legemidlers farmakokinetikk er endret i pasienter med inflammasjon, infeksjon og kreft (30-32).

Mange kjemiske mediatorer er assosiert med regulering av inflammatorisk respons, men det er kun primært enkelte cytokiner som har vist seg å være involvert i nedreguleringen av aktiviteten til legemiddelmetaboliserende enzymer og transportører ved inflammasjon (33, 34). Cytokiner er en gruppe av lav-molekylære glykoproteiner som produseres av en rekke celletyper som immuncellene makrofager, B- og T-lymfocytter og mastceller, men også av endotelceller, fibroblaster og stromalceller. Et enkelt cytokin kan produseres av mer enn én celletype. Cytokinene virker via sine respektive reseptorer, og er sentrale for celledsignaler, og da igangsetting, regulering og forsterkning av immunrespons. Cytokinekspresjon er primært et resultat av traume eller inflammasjon, og produseres normalt ikke konstitutivt (35). Cytokiner kan inndeles i interleukiner (IL), interferoner (INF) og tumor nekrose faktor (TNF), og det forekommer både proinflammatoriske og antiinflammatoriske cytokiner. De proinflammatoriske cytokinene IL-6, INF γ , TNF α og IL-1 β er ansett som de mest potente for modulerende av endring i CYP-aktivitet/ekspressjon (33, 34, 36, 37).

Mekanismen for hvordan cytokiner induserer endringer i enzymekspressjon er ikke fullt klarlagt, men det er antatt at redusert CYP-aktivitet og -ekspressjon er et resultat av transkripsjonell suppresjon, og til dels post-translasjonell proteinmodifikasjon via andre inflammasjons- og infeksjonsassosierte mediatorer (34, 36). En teori er at når cytokiner bindes til reseptorer på overflaten av celler i målorganer, aktiverer de intracellulære signalsystemer som regulerer gentranskripsjon av legemiddelmetaboliserende enzymer og transportører (33, 38).

Nedregulert ekspressjon og aktivitet av CYP-enzymmer og legemiddeltransportører som følge av inflammasjon kan medføre nedsatt legemiddeleliminasjon, økt plasmakonsentrasjon av legemidlet og toksisitet (33). Konsekvensene vil trolig være størst dersom legemidlet har smalt terapeutisk vindu (36). Det også rapportert om gjenoppretting av en dempet CYP-

ekspresjon/-aktivitet gjennom vellykket behandling av inflammasjonstilstanden (31). Dette gir opphav til en motsatt effekt enn den vi ser ved inflammasjon, og konsekvensene for pasienter med inflammatorisk sykdom som behandles kan være økt legemiddeleliminasjon, nedsatt legemiddelkonsentrasjon i plasma og tap av klinisk effekt (33). Figur 1.1 oppsummerer effekten av inflammasjon og behandling av inflammasjon på CYP-ekspresjon/-aktivitet, samt hvordan dette kan påvirke et legemiddels farmakokinetikk illustrert av likevektskonsentrasjoner av legemidlet i plasma.



Figur 1.1 Effekt av inflammasjon (t.v.) og behandling av inflammasjon (t.h.) på CYP-ekspresjon/-aktivitet og likevektskonsentrasjoner av legemidler i plasma. Nedsatt CYP-ekspresjon/-aktivitet kan medføre nedsatt legemiddeleliminasjon og økte plasmakonsentrasjoner av legemidler. Behandling av inflammasjonstilstanden med antiinflammatoriske legemidler kan gjenopprette en dempet CYP-fenotype slik at legemiddeleliminasjonen normaliseres og dermed reduseres likevektskonsentrasjoner av legemidler i plasma.

1.4.1 Revmatoid artritt

Revmatoid artritt (RA) er en kronisk, inflammatorisk, autoimmun leddsykdom som over tid kan føre til benerosjon, ødeleggelse av brusk, og hos noen fullstendig ødeleggelse av ledd. Prevalensen av RA i vestlige land er 0.5-1 % i den voksne befolkningen, med en 2-3 ganger høyere forekomst hos kvinner enn hos menn (39). Symptomene ved RA manifesterer seg som

symmetriske leddbetennelser som kan medføre betydelig smerte, funksjonstap og sykkelighet. Det er ukjent hva som er årsaken til sykdommen, men genetiske, miljømessige og hormonelle faktorer er antatt å ha betydning for utvikling av inflammasjonen som i hovedsak er lokalisert til synovialhinnen (39). Et komplekst, interaktivt nettverk av celler og cytokiner er involvert i patogenesen ved RA. Synovialhinnen infiltreres av T-celler, B-celler og makrofager, som igjen aktiverer andre cellepopulasjoner. TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 og IL-23 er sentrale proinflammatoriske cytokiner i inflammasjonsprosessen ved RA (40).

Avhengig av om det foreligger IgM revmafaktor eller anti-CCP-antistoff (cyklisk citrullinert peptid) klassifiseres sykdommen etter ICD-10 kodeverket som enten «M05 Seropositiv revmatoid artritt» eller «M06 Annen revmatoid artritt» (39). Inflammasjonsmarkørene CRP og SR er ofte forhøyet ved RA, og inngår i de internasjonalt aksepterte diagnosekriteriene definert av ACR/EULAR (American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism) (41). Både CRP og SR benyttes i monitorering av sykdomsforløp og evaluering av behandlingseffekt, men som nevnt tidligere er ikke resultatene alltid sammenfallende (24). Flere studier har også vist at markørene påvirkes av ikke-inflammatoriske faktorer som alder og kjønn, noe som kan medføre over- eller underestimering av inflammasjonsaktiviteten (25, 42).

Kurativ behandling av RA finnes ikke, og behandlingsmålene er bygget rundt oppnåelse av remisjon, lindring av symptomer og smerter, beskyttelse av ledd og oppnåelse optimalt funksjonsnivå og god livskvalitet (39). Pasientene behandles med en tverrfaglig tilnærming med farmakologiske og ikke-farmakologiske virkemidler. Den farmakologiske behandlingen kan inndeles i symptomdempende og sykdomsmodifiserende, og legemidlene som benyttes er NSAIDs, COX-2-hemmere, rene analgetika, kortikosteroider og sykdomsmodifiserende antirevmatiske legemidler (DMARDs) (39). DMARDs kan videre inndeles i syntetiske DMARDs og biologiske DMARDs (bDMARDs), og er en viktig legemiddelgruppe ved RA da studier har vist at tidlig intervensjon bedrer langtidsprognosen (43).

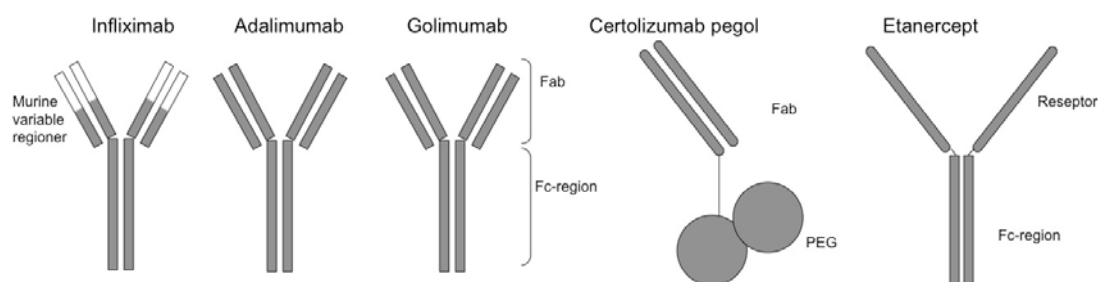
RA er en sykdom som er forbundet med forhøyede nivåer av IL-6 (40). Det er rapportert at CYP-metaboliserte legemidler har endret farmakokinetikk i RA-pasienter. I en studie av Mayo *et al.* hadde RA-pasienter tregere eliminering og 3-4 ganger høyere systemisk eksponering av verapamil sammenlignet med friske frivillige (44). Høyere plasmakonsentrasjon av simvastatin, et annet CYP3A-substrat, er også rapportert i RA-

pasienter sammenlignet med friske personer (45). 1 og 5 uker etter behandling med IL-6-hemmeren tocilizumab (10 mg/kg) var arealet under tids-plasmakonsentrasjonskurven (AUC) for simvastatin redusert med henholdsvis 57 % og 39 % (45). CRP ble målt i studien, og endringer av CRP-konsentrasjon var parallell med endringer i simvastatins farmakokinetikk (45).

1.4.2 bDMARDs

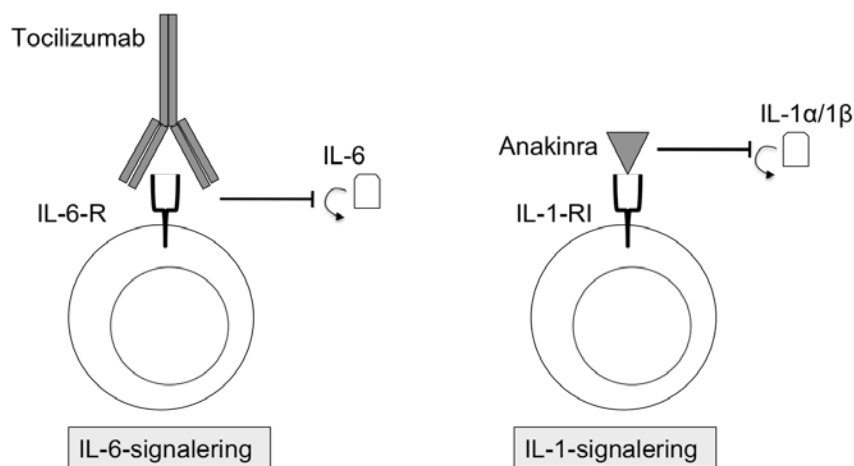
Siden introduksjonen av det første bDMARD, Remicade[®] (infliximab), for rundt tjue år siden har disse midlene fått en stadig mer sentral plass i RA-behandlingen (39, 46). bDMARDs er proteinlegemidler produsert med rekombinant DNA-teknologi (46). Disse legemidlene, som også blir kalt biologiske legemidler, er selektive immunmodulatorer som virker målrettet og effektivt inn i immunprosessen ved å hemme proinflammatoriske cytokiner, T-celler eller B-celler.

Cytokinet TNF α har en viktig patogenetisk rolle ved RA, og TNF α -hemmere er en gruppe bDMARDs som inhiberer TNF α -mediert cellulær respons (40, 46). Fem ulike TNF α -hemmere er tilgjengelige og godkjente for bruk i Norge (figur 1.2). Fire av legemidlene i gruppen, infliximab, adalimumab, golimumab og certolizumab pegol, er monoklonale antistoffer. Ved å binde seg til både fritt og membranbundet TNF α , forhindrer de interaksjon mellom TNF α og dens reseptorer på celleoverflaten (47-50). De monoklonale antistoffene med Fc-del (alle unntatt certolizumab pegol) vil også kunne indusere komplement- og antistoffindusert apoptose av de aktuelle cellene (47-50). Den siste TNF α -hemmeren, etanercept, er en dimer av et kimært humant fusjonsprotein bestående av Fc-delen på IgG1 og TNF-reseptor p75, og virker ved å kompetitivt hindre at TNF (α og β) bindes til sine membranbundne reseptorer (51).



Figur 1.2 Oversikt over TNF α -hemmende legemidler for behandling av revmatoid artritt.

IL-1 α og -1 β , og IL-6 er andre proinflammatoriske cytokiner som er farmakologiske angrepspunkt for bDMARDs (figur 1.3) (46). Tocilizumab er et monoklonalt antistoff mot IL-6-reseptor (IL-6-R). Ved binding av antistoffet til løselige og membranbundne IL-6-reseptorer (sIL-6-R og mIL-6-R) inhiberes sIL-6-R- og mIL-6-R-mediert signalisering (52). Anakinra er en rekombinant versjon av IL-1-reseptorantagonist (IL-1Ra) (46). IL-1 α og IL-1 β utøver sin effekt gjennom IL-1 type I-reseptor (IL-1-RI). Denne effekten hemmes av den naturlig forekommende IL-1Ra ved at antagonisten bindes til IL-1-RI uten å aktivere reseptoren (46). Ved å kompetitivt binde seg til IL-1-RI inhiberer anakinra IL-1 α - og IL-1 β -mediert signalering (53).

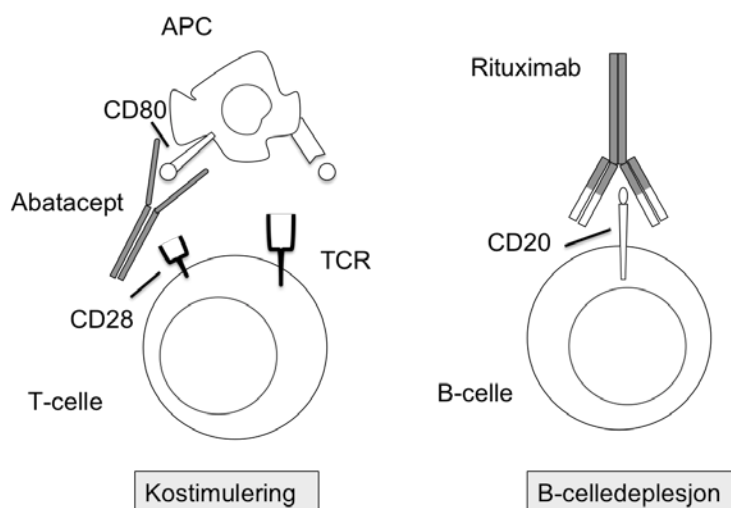


Figur 1.3 Tocilizumab og anakinra virker ved å inhibere hhv. interleukin (IL)-6- og -1-mediert signalering. IL-6-R = interleukin-6-reseptor, IL-1-RI = interleukin-1 type I-reseptor.

T-cellehemmeren abatacept virker ved å modulere et kostimulerende nøkkelsignal ved antigenpresentasjon som er nødvendig for full aktivering av visse T-lymfocytter (54).

B-cellehemmeren rituximab er et kimært (humant/murint) monoklonalt antistoff mot antigenet CD20, et plasmaprotein uttrykt på pre-B- og modne B-lymfocytter. Binding av rituximab til CD20 medierer B-celle-lysering, og medfører dermed B-celledeplesjon (55).

Figur 1.4 illustrerer virkningsmekanismen til abatacept og rituximab.



Figur 1.4 Abatacept modifierer kostimulerende nøkkelsignal nødvendig for full aktivering av T-lymfocytter. Rituximab er et kimært monoklonalt antistoff mot CD20 og medfører B-celledepleksjon. APC = antigenpresenterende celle, TCR = T-cellereseptor.

Biologiske legemidler er makromolekyler og har en ulik farmakokinetikk sammenlignet med lav-molekylære legemidler (56). Elimineringen av biologiske legemidler skjer hovedsakelig via renal filtrasjon, proteolyse eller reseptormediert eliminering, og involverer ikke CYP-enzymene (57). Da disse legemidlene ikke metaboliseres av CYP-enzymene var det på generelt grunnlag antatt at biologiske legemidler ikke var involvert i metabolismebaserte interaksjoner med lav-molekylære legemidler (58). Økt kunnskap om at proinflammatoriske cytokiner kan nedregulere ekspresjon og aktivitet av CYP-enzymene har ført til at denne oppfattelsen er blitt endret. Innvirkning på cytokinnivåer med bDMARDs kan føre til normalisering av CYP-enzymenes aktivitet, og dermed kan bDMARDs indirekte føre til interaksjoner med lav-molekylære legemidler som metaboliseres av CYP-enzymene.

1.5 Biomarkører for legemiddelmetaboliserende enzymer

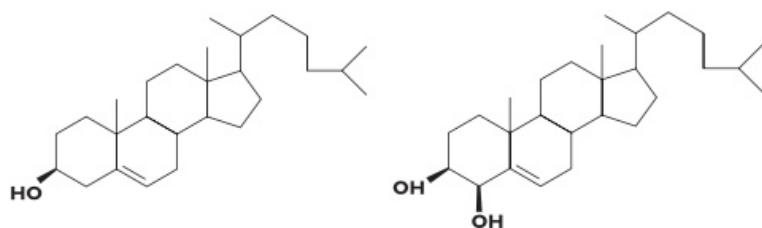
Fenotyping er en nyttig metode for å estimere den metabolske kapasiteten til legemiddelmetaboliserende enzymer, og kan utføres ved å gjøre konsentrasjonsmålinger av spesifikke, eksogene eller endogene, biomarkører i plasma eller urin (15). For fenotyping av flere metabolismeveier benyttes ofte en «cocktail» med flere markører for å effektivt undersøke aktiviteten til flere enzymer samtidig (59). Flere potensielle biomarkører har blitt foreslått som modellsubstrater for fenotyping av de enkelte CYP-enzymene, men hittil er ingen ideelle biomarkører identifisert (60). En optimal biomarkør burde blant annet være trygg å bruke, enkel å måle og korrelere sterkt med fenotype. Da fenotype reflekterer kombinasjonen av genetikk og miljøfaktors innvirkning på CYP-enzymenes aktivitet kan

fenotyping ha stor klinisk betydning (60). Til tross for dette er fenotyping av CYP-enzymmer lite brukt i klinisk praksis (15).

Å finne en optimal biomarkør for CYP3A-fenotype er sett på som spesielt viktig da disse enzymene er involvert i metabolismen av over 50 % av alle legemidler på markedet og genotype ikke er avgjørende for den store variasjonen observert i enzymenes metabolske kapasitet (12, 19). Flere biomarkører har blitt undersøkt som potensielle biomarkører for CYP3A-fenotype, blant annet midazolam, ^{14}C -erytromycin, nifedipin, dapsone, alfentanil, lidokain, kortisol og kinin (59, 60). Selv om flere av disse har vist seg å være spesifikke og sensitive markører for CYP3A-fenotype, vil tilleggseksposering av eksogene markører innebære en ugunstig bivirkningsrisiko for pasientene. Denne ulempen unngås med endogene biomarkører. CYP3A-enzymet metaboliserer blant annet kortisol til 6 β -hydroksykortisol, og 6 β -hydroksykortisol:kortisol-ratio målt i urin er en mye studert endogen biomarkør for CYP3A-fenotype (61, 62). Stor variasjon i kortisolsekresjon grunnet en rekke faktorer som ikke er betinget av CYP3A-fenotype, medfører at heller ikke denne markøren er optimal (62).

1.5.1 4 β -hydroksykolesterol

Bodin *et al.* lanserte på begynnelsen av 2000-tallet 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K, figur 1.5) som en potensiell endogen CYP3A4-biomarkør (63, 64). 4 β -OH-K er en kolesterolmetabolitt, et oksysterol, som gjenfinnes i plasma i relativt høye konsentrasjoner (64). Sammenhengen mellom 4 β -OH-K og CYP3A4 ble registrert da det ble målt forhøyede plasmakonsentrasjoner av 4 β -OH-K i pasienter behandlet med karbamazepin, fenytoin og fenobarbital, kjente CYP3A-induserende legemidler (64). Kunnskap om oksysterolets dannelse og metabolisme har tidligere vært lite kjent, men studier har vist at 4 β -OH-K hovedsakelig dannes enzymatisk via CYP3A4 og CYP3A5, og i mindre grad via autooksidering av kolesterol (64, 65). Diczfalusy *et al.* har i flere studier undersøkt 4 β -OH-K som en mulig endogen biomarkør for CYP3A4/5 (CYP3A)-fenotype (65, 66).



Figur 1.5 Kjemisk struktur av kolesterol og 4 β -hydroksykolesterol

Studier har vist at konsentrasjonsnivået av 4 β -OH-K i serum hos friske voksne er i størrelsesordenen 50-125 nmol/L (64, 66, 67). Etnisitet, antall aktive CYP3A5-alleler og kjønn er faktorer som er observert å ha betydning for 4 β -OH-K-nivået (65, 68). Det er rapportert at pasienter behandlet med legemidler som er kjente indukere av CYP3A har opptil 10-20 ganger høyere 4 β -OH-K-nivåer sammenlignet med friske, ubehandlede kontroller (64, 69, 70). En motsvarende, men relativt mye mindre reduksjon er sett på 4 β -OH-K-nivået ved behandling med CYP3A4-hemmende legemidler (69, 71). Generelt metaboliseres oksysteroler videre til gallesyrer via 7 α -hydroksylering som den hastighetsbestemmende reaksjonen (63). 4 β -OH-K er anslått å ha en halveringstid på 17 dager, noe som resulterer i stabile sirkulerende nivåer (66). Den lange halveringstiden er en fordel ved målinger ved steady state-tilstander, men ekskluderer 4 β -OH-K som markør ved raske endringer av CYP3A-aktivitet, som for eksempel ved bruk av potente CYP3A4-hemmere (66).

I studier med CYP3A-induksjon har 4 β -OH-K vist godt samsvar med metabolsk ratio av kinin (70), midazolam (72) og 6 β -hydroksykortisol:kortisol-ratio i urin (73, 74). Lavere p-verdier for forskjellene før og etter behandling, og lavere intra- og interindividuell variabilitet gjør 4 β -OH-K til en mer sensitiv og sikrere prediktor sammenlignet med 6 β -hydroksykortisol:kortisol-ratio (73, 74). 4 β -OH-K:kolesterol-ratio har blitt foreslått som en bedre egnet markør for CYP3A-aktivitet enn 4 β -OH-K alene, da den tar høyde for interindividuell variasjon i kolesterolnivå. Kolesterolnivå i serum har derimot vist å ha mindre betydning for konsentrasjonen av 4 β -OH-K enn først antatt. I en studie med 440 personer var det kun 9 % av variasjonen i 4 β -OH-K-konsentrasjonen som kunne tilskrives variasjon i serumkolesterolnivå, mens 91 % var assosiert med andre faktorer (65). Den svake korrelasjonen mellom plasmakonsentrasjoner av 4 β -OH-K og kolesterol medvirker til at det er tilstrekkelig å måle kun 4 β -OH-K.

4 β -OH-K ble benyttet i en studie av Björkhem-Bergman *et al.* for å undersøke sammenhengen mellom 25-hydroksyvitamin D og CYP3A-fenotype, samt sammenhengen mellom inflammasjon, målt som CRP, og CYP3A-fenotype (75). Resultatene fra studien kunne ikke vise signifikant korrelasjon mellom 25-hydroksyvitamin D og 4 β -OH-K, men det ble observert en statistisk signifikant negativ sammenheng mellom 4 β -OH-K og CRP (75).

1.6 Hensikt

Den primære hensikten med masterprosjektet var å undersøke om CYP3A-fenotype, målt som konsentrasjon av 4 β -OH-K,

- endres etter oppstart med bDMARDs hos leddgiktpasienter
- var ulik mellom leddgiktpasienter og personer uten kjent inflammatorisk sykdom.

Sekundært var det interessant å undersøke i hvilken grad 4 β -OH-K var knyttet til inflammasjonsstatus, målt som CRP og SR, før og etter oppstart med bDMARDs.

2 Metode

2.1 Materiale

Revmatoid artritt (RA)-pasienter (testgruppe)

Biobankede serumprøver fra registerstudien NOR-DMARD, utført ved revmatologiske avdelinger ved fem sykehus i Norge, koordinert av Revmatologisk avdeling, Diakonhjemmet Sykehus, ble i denne masteroppgaven benyttet for reanalyse av 4 β -OH-K. Serumprøver fra pasienter behandlet med bDMARDs mot RA ble inkludert i masteroppgaven. Aktuelle serumprøver fra NOR-DMARD-studien ble oppbevart ved -80 °C før analyse av 4 β -OH-K. Tilleggsinformasjon om pasientenes kjønn, alder, diagnose, type bDMARD, CRP og SR ble hentet fra NOR-DMARD-studien. Datamaterialet ble sortert og systematisert i Microsoft Excel 2003.

Levetiracetam-behandlede pasienter (kontrollgruppe)

Tilfeldig valgte levetiracetam-behandlede pasienter med CRP-konsentrasjon <5 mg/L utgjorde kontrollgruppen. Serumprøver fra pasienter som hadde målt konsentrasjon av levetiracetam ved Senter for Psykofarmakologi (SFP) i perioden 1. - 31. januar 2015 ble lagt til side for reanalyse av 4 β -OH-K og måling av CRP. Serumprøvene ble oppbevart ved -20 °C før reanalyse. CRP-måling ble utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Diakonhjemmet Sykehus. TDM-databasen SWISSLAB[®] ved SFP ble benyttet for å hente ut informasjon om alder, kjønn og komedikasjon. Oppgitte rekvirerte legemidler og legemidler gjenfunnet i serumprøvene ble gjennomgått med tanke på om de var kjente for å kunne påvirke serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K. Kjente hemmere eller indukere av CYP3A ble identifisert ved hjelp av interaksjonstabellen til Division of Clinical Pharmacology, Indiana University (22). Pasienter samtidig behandlet med legemidler klassifisert som hemmere eller indukere av CYP3A ble ekskludert. Datamaterialet ble bearbeidet i Microsoft Excel 2003.

2.2 Serumkonsentrasjonsanalyser

Serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K ble bestemt ved bruk av en tidligere validert metode utviklet for analyse av 4 β -OH-K. Grunnet utfellingsreaksjoner ble det gjort modifiseringer av prøveopparbeidelsen i den opprinnelige metoden. Hovedmodifiseringen var et ekstra

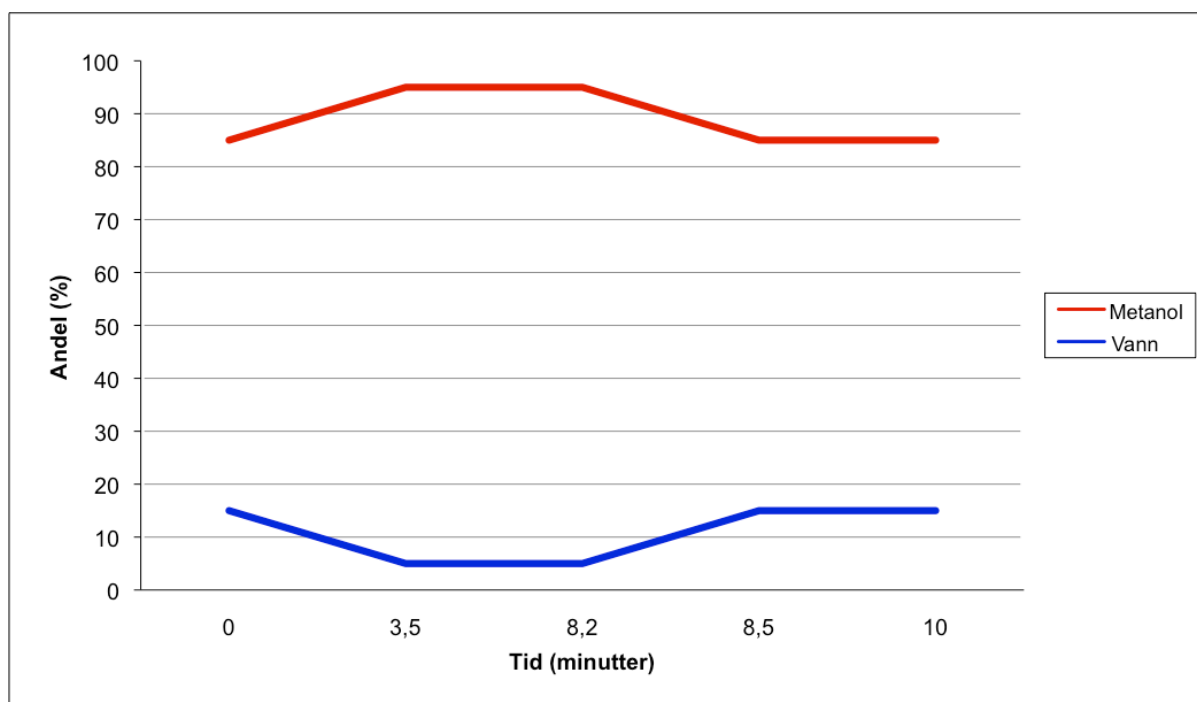
filtreringstrinn før injeksjon i UPLC-APCI-MS/MS-apparatet. Analyse av prøvene ble gjennomført i løpet av fem dager i tidsperioden 6. februar - 2. mars 2015.

2.2.1 Prøveoppbehandling

Prøveoppbehandling var basert på væske/væske-ekstraksjon. 500 µL serumprøve ble tilsatt 50 µL internstandard (10 µM 4β-hydroksykolesterol-d₇ (4β-OH-K-d₇), Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Ontario, Canada) i metanolløsning og 1 mL 1 M fersk natriummetoksid-løsning i etanol. Blandingen ble stående på benken i 20 minutter for fullstendig hydrolysering av esterbindingene mellom 4β-OH-K og lange fettsyrer i serum. Deretter ble 1 mL vann og 4 mL heksan tilsatt for å skille hydrofile og hydrofobe stoffer fra hverandre. For å sikre godt ekstraksjonsutbytte og et klart skille mellom væskefasene ble blandingen vendt opp ned i to minutter før den ble sentrifugert ved 2500 g i 5 minutter ved 20 °C. Blandingen ble deretter satt i en fryser ved temperatur -80 °C i 25 minutter for å fryse vannfasen. Den organiske fasen kunne så helles over i nye rør og dampes inn til tørrhet ved bruk av lett nitrogengass-spray. Inndampet prøve ble så reløst i 500 µL metanol. Etter reløsing ble utfelling fremprovosert ved nedkjøling i fryseskap ved temperatur -20 °C i 15 minutter før filtrering med Costar[®] Spin-x HPLC Micro Centrifuge Filter, 0.2 µm Nylon Filter og sentrifugering ved 2500 g i 6 minutter ved 2 °C. Filtrert ekstrakt ble overført til vialer og plassert i autosampler for analyse.

2.2.2 UPLC-APCI-MS/MS-analyse

Et væsekromatografisystem av typen Aquility «ultra performance liquid chromatography» (UPLC) koblet til en Micromass Quattro Premier tandem massespektrometrisk (MS/MS) detektor fra Waters (Milford, MA, USA) ble benyttet for analysering av prøveløsningen etter ekstraksjonen. Kolonnen som ble brukt for separasjon av stoffene var en Aquility UPLC BEH Shield RP18 1.7 µm, 1 x 100 mm; Waters med temperatur 40 °C. Det ble injisert et prøveløp på 10 µL og analysetiden for metoden var 10 minutter per prøve. Mobilfasen bestod av vann og metanol og det ble benyttet gradienteluering med sammensetning som vist i figur 2.1. Mobilfasehastigheten var 0.150 mL/min.



Figur 2.1 Mobilfasesammensetning under UPLC-APCI-MS/MS-analysen.

Ionekilden var en APCI-probe innstilt i positiv mode. Spesifikasjoner er angitt i tabell 2.1.

Tabell 2.1 Spesifikasjoner for «atmospheric pressure chemical ionization (APCI)»-probe innstilt i positive mode ved bruk av MS/MS-detektor.

Temperatur i ionekilde	130 °C
Temperatur ved frigjøring av analytt fra frie ioner i mobilfasen	600 °C
Elektrisk spenning på APCI-nålen	10 µA
Gassgjennomstrømning på prøvekønen	90 L/t
Gassgjennomstrømning ved frigjøring av analytt fra frie ioner i mobilfasen	600 L/t

For deteksjonen av 4β-OH-K og 4β-OH-K-d₇ ble følgende masseoverganger benyttet ved hjelp av «multiple reaction monitoring» (MRM) i MS/MS-detektoren:

- 4β-OH-K m/z 385.25 → 367.45
- 4β-OH-K-d₇ m/z 392.30 → 374.50

Analysemetoden var validert for nøyaktighet og presisjon, og ved hver analyseserie ble det analysert humane blankserumprøver. Topphøydene og retensjonstidene ble bearbeidet og bestemt ved hjelp av dataprogrammet MassLynx versjon 4.1 (Waters, Milford, MA, USA). Topphøyden til 4β-OH-K, justert for topphøyden til 4β-OH-K-d₇, ble brukt som

signal/responsvariabel i metoden. Konsentrasjonen av 4 β -OH-K ble kalkulert basert på en lineær standardkurve (vektet 1/y). Standardkurven var basert på åtte standardløsninger av kjente konsentrasjoner 4 β -OH-K i området 25-1600 nmol/L. 25 nmol/L var laveste kvantifiseringsgrense (eng. lower limit of quantification, LLOQ). Etter bearbeiding av kromatogrammene ble topphøydene og retensjonstidene for 4 β -OH-K og 4 β -OH-K-d₇ overført til Microsoft Excel 2003. Et gjennomsnitt av 4 β -OH-K-konsentrasjonen ble beregnet basert på to paralleller fra hver analyse.

2.3 Målvariabler

I studien ble CYP3A-fenotype målt som serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K. For å undersøke om CYP3A-fenotype endres etter oppstart med bDMARDs hos leddgikt pasienter, ble serumkonsentrasjoner av 4 β -OH-K før og 3 måneder etter påbegynt behandling med bDMARDs sammenlignet. Relative endringer i CYP3A-fenotype ble definert som ratio mellom serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K etter 3 måneder dividert med serumkonsentrasjon av 4 β -OH-K før oppstart av behandling med bDMARDs. Ratio >1 indikerte økning i CYP3A-fenotype etter 3 måneders behandling, mens ratio <1 indikerte reduksjon i CYP3A-fenotype etter 3 måneders behandling.

For å undersøke om CYP3A-fenotype, målt som 4 β -OH-K, var forskjellig mellom leddgikt pasienter og personer uten kjent inflammatorisk sykdom ble 4 β -OH-K-konsentrasjoner hos RA-pasienter sammenlignet med 4 β -OH-K-konsentrasjoner hos levetiracetam-behandlede pasienter uten inflammasjon.

I hvilken grad CYP3A-fenotype var knyttet til inflammasjonsstatus, målt som CRP og SR, ble evaluert basert på korrelasjonsanalyser mellom 4 β -OH-K og CRP/SR.

2.4 Statistiske analyser

Statistikkprogrammet GraphPad Prism versjon 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) ble benyttet i de statistiske analysene og for utarbeidelse av grafiske fremstillinger. CRP, SR og serumkonsentrasjoner av 4 β -OH-K hos RA-pasientene ved baseline og etter 3 måneder ble sammenlignet ved parrede, ikke-parametriske, to-halede Wilcoxon signed rank tester. En ikke-parametrisk, to-halet Mann-Whitney test ble brukt for å sammenligne 4 β -OH-K-konsentrasjon i test-gruppene (baseline og etter 3 måneder) med kontrollgruppen.

Sammenheng mellom CRP og SR med 4 β -OH-K-konsentrasjonen ved baseline og tilsvarende etter 3 måneder ble undersøkt ved univariat korrelasjonsanalyse (Spearman's signed rank test). Det ble satt et signifikansnivå på $p < 0.05$.

2.5 Etikk og godkjenninger

De delene av prosjektet som omfattet reanalysering av 4 β -OH-K i pasientprøver var forhåndsgodkjent av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK-referansenr.:2014/1191-1) og Forskningsutvalget ved Diakonhjemmet Sykehus. Under prosjektet fikk prosjektmedlemmer tilgang til pasientinformasjon gjennom SWISLAB[®]. Personlige opplysninger som ikke var anonymisert ble imidlertid kun brukt og oppbevart på lokal PC ved SFP for å unngå at sensitiv informasjon skulle komme på avveie. Ved e-postoversendelser av pasientdata ble det benyttet passordsikrede datafiler.

3 Resultater

3.1 Datamateriale

Revmatoid artritt (RA)-pasienter (testgruppe)

Fra NOR-DMARD-studien var serumprøver fra 115 pasienter med RA og behandlet med bDMARDs aktuelle for reanalysering av 4 β -OH-K. Kun pasienter med tilgjengelige serumprøver ved baseline og 3 måneder etter oppstart med bDMARD-behandling, og med inflammasjonsmarkørmålinger ved samme tidspunkt ble inkludert i masterprosjektet. Dette medførte eksklusjon av 56 pasienter etter følgende kriterier: manglende serumprøve ved et av tidspunktene (n=37), manglende inflammasjonsmarkørmålinger (n=11) og utilstrekkelig volum av serumprøve for reanalysering av 4 β -OH-K (n=8).

De 59 pasientene som ble inkludert i masterprosjektet startet behandling med til sammen åtte ulike bDMARDs. De ulike bDMARDs ble stratifisert i undergrupper basert på legemidlenes biologiske angrepspunkt: TNF α -hemmere (adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab og infliximab), IL-6-hemmer (tocilizumab) og B-cellehemmer (rituximab). Deskriptive data for de inkluderte pasientene og oversikt over hvilke bDMARDs pasientene ble behandlet med er presentert i henholdsvis tabell 3.1 og 3.2.

Levetiracetam-behandlede pasienter (kontrollgruppe)

Totalt ble 70 serumprøver hvor det var blitt gjort serumkonsentrasjonsanalyser av levetiracetam ved SFP i perioden 1. - 31. januar 2015 tatt ut for analyse av 4 β -OH-K og måling av CRP. Etter å ha gjennomgått pasientenes legemiddelbruk oppgitt i rekvisisjoner, legemidler gjenfunnet i serumprøver og CRP-konsentrasjoner ble 52 pasienter inkludert i kontrollgruppen. CRP-konsentrasjoner >5 mg/L (n=16), utilstrekkelig volum av serumprøve for analysering av 4 β -OH-K (n=1) og samtidig behandling med CYP3A-induser (n=1, karbamazepin) førte til eksklusjon fra kontrollgruppen. I kontrollgruppen var andelen kvinner og median alder lavere enn i testgruppen, hhv. 56 vs. 86 % og 43.5 vs. 56 år. Deskriptive data for kontrollgruppen er presentert i tabell 3.1.

Tabell 3.1 Deskriptive data for de inkluderte pasientene.

	Testgruppe	Kontrollgruppe
Antall pasienter	59	52
Antall kvinner (prosent)	51 (86 %)	29 (56 %)
Alder, median (spredning)	56 år (19-76 år)	43.5 år (5-85 år)
RA-diagnose, ICD-10 (M05.8/M05.9/M06.0) ¹	20/30/9	-
Antall dager mellom baseline og neste prøvetakingstidspunkt, median (spredning)	91 (53-170)	-

¹ M05.8: Annen spesifisert seropositiv revmatoid artritt, M05.9: Uspesifisert seropositiv revmatoid artritt, M06.0: Seronegativ revmatoid artritt

Tabell 3.2 Oversikt over hvilke biologiske DMARDs revmatoid artritt-pasientene ble behandlet med.

bDMARDs	n	Andel kvinner (prosent)	Alder, år ¹	ICD-10 ² 5.8/5.9/6.0	Dager mellom målinger ¹
TNFα-hemmere	47	83 %	56 (19-76)	16/22/9	91 (53-170)
Certolizumab pegol	31	80 %	58 (21-76)	13/13/5	91 (69-170)
Golimumab	7	86 %	44 (28-68)	1/4/2	93 (57-126)
Etanercept	6	83 %	43 (19-54)	1/3/2	97 (84-128)
Infliximab	2	100 %	51.5 (34-69)	1/1/0	75 (53-97)
Adalimumab	1	100 %	65	0/1/0	53
IL-6-hemmer	6	100 %	60 (31-75)	1/5/0	96 (80-127)
Tocilizumab					
B-cellehemmer	6	100 %	54.5 (36-59)	3/3/0	107 (61-150)
Rituximab					

¹ Data presentert som median (spredning) ² M05.8: Annen spesifisert seropositiv revmatoid artritt, M05.9: Uspesifisert seropositiv revmatoid artritt, M06.0: Seronegativ revmatoid artritt

3.2 Inflammasjonsmarkører

CRP-målinger ved oppstart og 3 måneder etter påbegynt behandling med bDMARDs var tilgjengelig fra 58 av de 59 pasientene i RA-gruppen. 57 av pasientene hadde også SR-målinger fra samme tidspunkt. Median CRP og SR var redusert, henholdsvis 6 til 2 mg/L ($p=0.07$, ikke signifikant forskjell) og 23 til 14 mm/h ($p<0.002$) etter behandling med bDMARDs. Tabell 3.3 og 3.4 presenterer målinger ved baseline, etter 3 måneder, relativ endring og p-verdier for henholdsvis CRP og SR. Relativ endring av

inflammasjonsmarkørene varierte fra 2-13 ganger økning til mer enn 90 % reduksjon etter oppstart av bDMARD-behandling blant de ulike pasientene (figur 3.1).

Tabell 3.3 C-reaktivt protein (CRP)-nivåer ved baseline og 3 måneder etter oppstart med biologiske DMARDs.

CRP (mg/L)	n	Baseline ¹	Etter 3 mnd ¹	Ratio ^{1,2}	P-verdi [*]
Alle RA-pasienter	58	6 (1-69)	2 (1-100)	1.00 (0.01-13.00)	0.0668
TNFα-hemmere	46	6 (1-68)	3 (1-100)	1.00 (0.08-13.00)	0.5183
Certolizumab pegol	30	5 (1-52)	2 (1-100)	1.00 (0.08-13.00)	0.9330
Golimumab	7	5 (1-25)	3 (1-27)	1.00 (0.38-2.50)	0.8125
Etanercept	6	12 (1-68)	5 (1-19)	0.22 (0.09-4.00)	0.2188
Infliximab	2	9.5 (6-13)	18.5 (1-36)	1.47 (0.17-2.77)	-
Adalimumab	1	11	5	0.45	-
IL-6-hemmer	6	4.5 (1-69)	1	0.25 (0.01-1.00)	0.1250
B-cellehemmer	6	8 (2-46)	3 (2-23)	0.50 (0.25-1.00)	0.0625

¹Data presentert som median (spredning), ²Ratio = relativ endring = CRP-konsentrasjon etter 3 måneder / CRP-konsentrasjon ved baseline, - Parrede tester krever ≥ 3 par

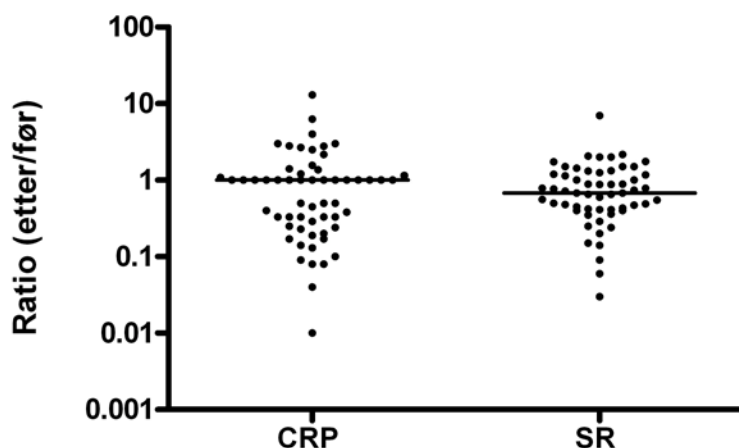
* P-verdier estimert med Wilcoxon signed rank-tester ved bruk av GraphPad Prism versjon 4.

Tabell 3.4 Senkningsreaksjon (SR)-nivåer ved baseline og 3 måneder etter oppstart med biologiske DMARDs.

SR (mm/h)	n	Baseline ¹	Etter 3 mnd ¹	Ratio ^{1,2}	P-verdi [*]
Alle RA-pasienter	57	23 (2-84)	14 (2-69)	0.68 (0.03-7.00)	0.0014
TNFα-hemmere	45	22 (2-84)	14 (2-69)	0.78 (0.09-7.00)	0.0461
Certolizumab pegol	29	23 (2-54)	14 (2-69)	0.78 (0.09-7.00)	0.3518
Golimumab	7	20 (3-84)	14 (6-62)	0.89 (0.65-2.00)	0.4688
Etanercept	6	23.5 (12-60)	11.5 (7-19)	0.44 (0.15-1.19)	0.1563
Infliximab	2	22 (16-28)	17.5 (7-28)	1.00 (0.25-1.75)	-
Adalimumab	1	30	23	0.77	-
IL-6-hemmer	6	24 (5-75)	2 (2-8)	0.17 (0.03-0.40)	0.0313
B-cellehemmer	6	24.5 (12-60)	19.5 (10-33)	0.67 (0.45-1.50)	0.0625

¹Data presentert som median (spredning), ²Ratio = relativ endring = SR-måling etter 3 måneder / SR-måling ved baseline, - Parrede tester krever ≥ 3 par

* P-verdier estimert med Wilcoxon signed rank-tester ved bruk av GraphPad Prism versjon 4.



Figur 3.1 Individuell variasjon i relativ endring av inflammasjonsmarkørene C-reaktivt protein (CRP) og senkningsreaksjon (SR) etter 3 måneders behandling med biologiske DMARDs. Linjene markerer median, hhv. 1 og 0.68 for CRP og SR. Ratio >1: økning etter 3 måneder, ratio <1: reduksjon etter 3 måneder. Y-aksen har logaritmisk skala.

Kontrollgruppen ble definert som levetiracetam-behandlede pasienter med CRP-konsentrasjoner <5 mg/L. Analysemetoden for CRP-måling hadde nedre kvantifiseringsgrense 0.30 mg/L. Målinger under denne grensen (n=5) ble satt til <0.30 mg/L. Mediankonsentrasjonen av CRP i denne gruppen var 0.99 mg/L og spredningen var mellom <0.30 og 4.54 mg/L.

3.3 4 β -hydroksykolesterol

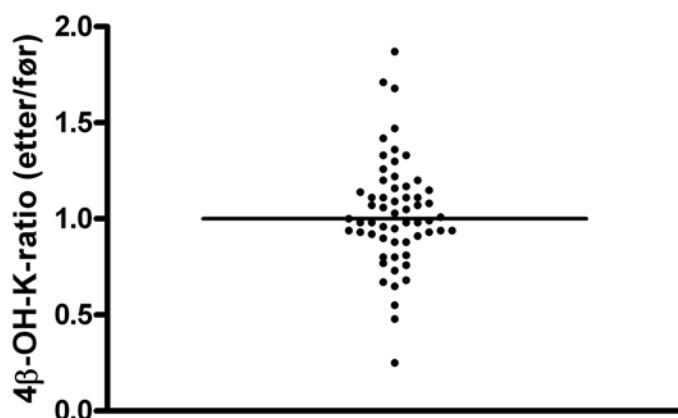
Konsentrasjonen av 4 β -OH-K ble kvantifisert i serumprøver fra de 59 pasientene i testgruppen før og etter påbegynt behandling med bDMARDs. I fire av serumprøvene ble det kvantifisert 4 β -OH-K-konsentrasjoner lavere enn analysemetodens LLOQ. Disse konsentrasjonene (17.3, 19.0, 20.0 og 21.5 nmol/L) må illegges noe usikkerhet, men er tatt med i beregningene. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K hos RA-pasientene ved baseline og etter 3 måneder med bDMARD-behandling, hverken ved å studere alle pasientene som en gruppe (median 50.0 vs. 51.6 nmol/L, p=0.91) eller etter å ha stratifisert pasientene i undergrupper basert på legemidlenes biologiske angrepspunkt (tabell 3.5). Figur 3.2 illustrerer relative serumkonsentrasjonsendring av 4 β -OH-K etter 3 måneder med bDMARD-behandling.

Tabell 3.5 Serumkonsentrasjoner av 4 β -hydroksykolesterol (nmol/L) hos revmatoid artritt-pasienter ved baseline og 3 måneder etter oppstart med biologiske DMARDs.

4 β -hydroksykolesterol-konsentrasjon (nmol/L)					
	n	Baseline ¹	Etter 3 måneder ¹	Ratio ^{1,2}	P-verdi [*]
Alle RA-pasienter	59	50.0 (17.3-246)	51.6 (20.0-217)	1.00 (0.25-1.87)	0.9054
TNFα-hemmere	47	49.1 (17.3-246)	52.9 (20.0-217)	1.00 (0.25-1.71)	0.8180
Certolizumab pegol	31	49.1 (17.3-246)	53.8 (20.0-217)	0.98 (0.25-1.71)	0.4837
Golimumab	7	46.8 (29.1-72.6)	46.6 (34.7-56.3)	1.17 (0.48-1.42)	0.3750
Etanercept	6	51.9 (34.6-172)	60.0 (34.1-126)	0.97 (0.73-1.33)	0.5625
Infliximab	2	82.4 (68.6-96.2)	90.5 (53.0-128)	1.05 (0.77-1.33)	-
Adalimumab	1	50.0	52.9	1.06	-
IL-6-hemmer	6	48.8 (19.0-164)	45.9 (27.9-182)	1.11 (0.67-1.47)	0.3125
B-cellehemmer	6	53.9 (28.4-104)	51.0 (27.2-125)	0.95 (0.68-1.87)	1.0000

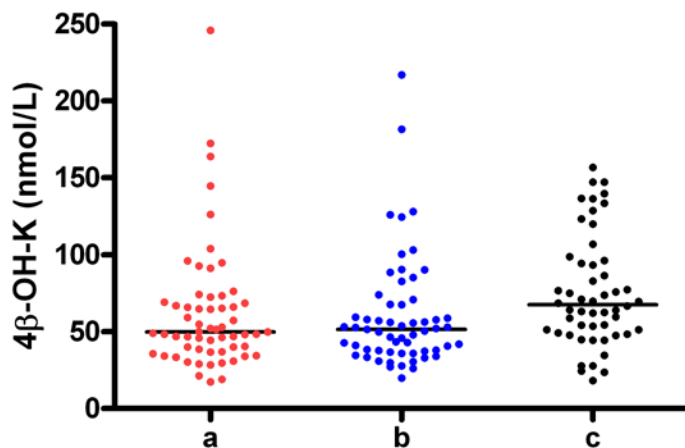
¹ Data presentert som median (spredning), ² Ratio = relativ endring = 4 β -OH-K-konsentrasjon etter 3 måneder / 4 β -OH-K-konsentrasjon ved baseline, - parrede tester krever ≥ 3 par

* P-verdier estimert med Wilcoxon signed rank-tester ved bruk av GraphPad Prism versjon 4.



Figur 3.2 Individuell variasjon i serumkonsentrasjonsendring av 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) etter 3 måneder med behandling med biologiske DMARDs. Linjen markerer median, 1. Ratio >1: økning av 4 β -OH-K-konsentrasjon etter 3 måneder, ratio <1: reduksjon av 4 β -OH-K-konsentrasjon etter 3 måneder.

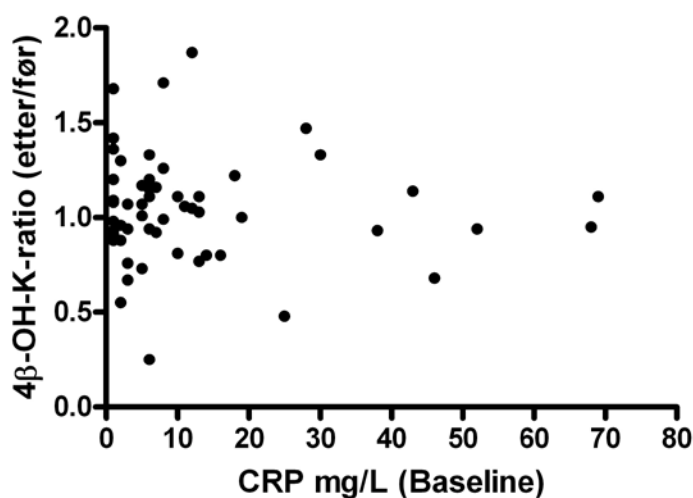
Mediannivåene av 4 β -OH-K i testgruppen var signifikant lavere enn i kontrollgruppen (median 67.7 nmol/L, spredning 18.2-157 nmol/L) ved begge tidspunkt (p=0.008 og p=0.0029, figur 3.3). Tre av 4 β -OH-K-konsentrasjonene (18.2, 23.6 og 24.5 nmol/L) kvantifisert i kontrollgruppen var lavere enn analysemetodens LLOQ, men ble tatt med i beregningene og bidrar til at resultatene må ilegges noe usikkerhet.



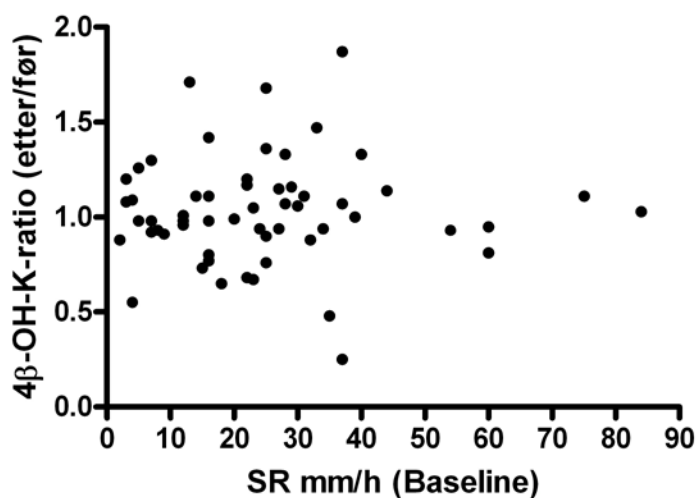
Figur 3.3 Målte konsentrasjoner av 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K) i serum hos pasienter med revmatoid artritt, før (a) og etter 3 måneder (b) med bDMARD-behandling (n=59), og hos levetiracetam-behandlede pasienter uten inflammatorisk sykdom (c) (n=52). Linjene markerer medianverdier. Medianverdiene hos pasientene med revmatoid artritt (50.0 og 51.6 nmol/L) var signifikant lavere enn medianverdien hos levetiracetam-behandlede pasienter uten inflammasjon (67.7 nmol/L, p=0.008 og p=0.0029).

Mediannivåene av 4 β -OH-K var ikke signifikant forskjellige mellom kvinner og menn i kontrollgruppen og ved baseline i testgruppen (hhv. median 64.3 vs. 69.8 nmol/L, p=0.5072 og median 51.7 vs. 41.3 nmol/L, p=0.2636), men etter 3 måneders behandling med bDMARDs var mediankonsentrasjonen i kvinner signifikant høyere enn i menn (median 53.0 vs. 37.4 nmol/L, p=0.0365).

Figur 3.4 og 3.5 viser at graden av og retningen på endringen i 4 β -OH-K-konsentrasjon var uavhengig av inflammatorisk aktivitet ved baseline.

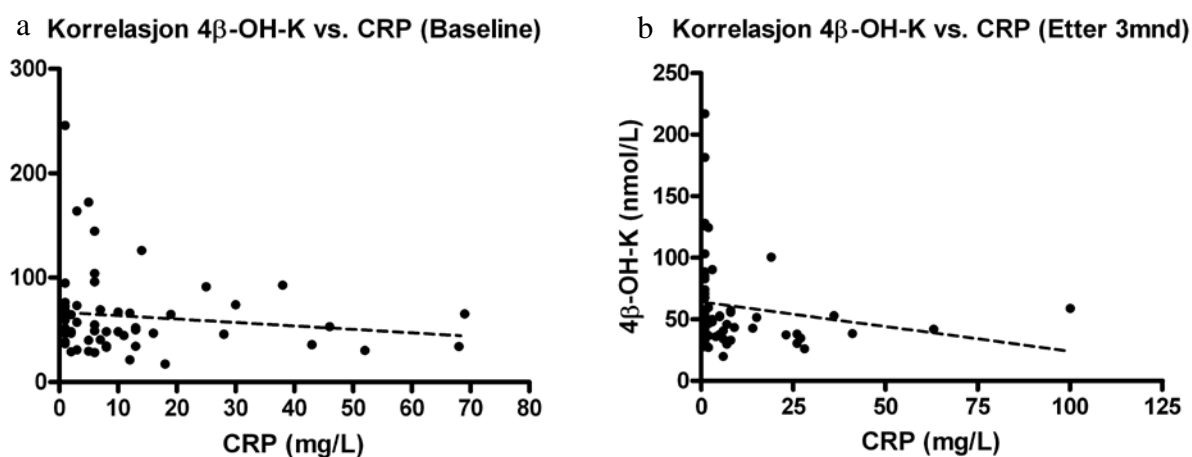


Figur 3.4 Korrelasjon mellom C-reaktivt protein (CRP) målt ved baseline og relativ serumkonsentrasjonsendring av 4 β -hydroksykolesterol (4 β -OH-K).

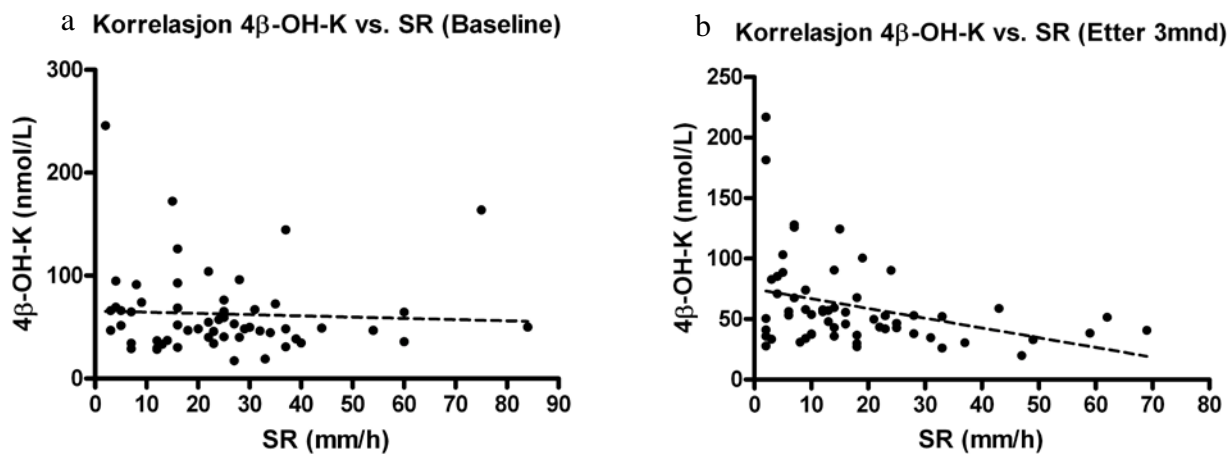


Figur 3.5 Korrelasjon mellom senkningsreaksjon (SR) målt ved baseline og relativ serumkonsentrasjonsendring av 4β-hydroksykolesterol (4β-OH-K).

Sammenhengen mellom inflammasjonsmarkørene og CYP3A-fenotype ved baseline og 3 måneder etter oppstart med behandling med bDMARDs ble undersøkt med Spearmans' rank korrelasjons test. Det var ingen korrelasjon mellom CRP eller SR og 4β-OH-K før behandling med bDMARDs ($p > 0.3$), men det var en signifikant negativ korrelasjon mellom CYP3A-fenotype og inflammasjonsmarkørene etter 3 måneder med bDMARD-behandling ($p < 0.01$, Spearman's r -0.40 (CRP) og -0.34 (SR)) (figur 3.6 og 3.7).



Figur 3.6 Korrelasjon mellom serumkonsentrasjon av C-reaktivt protein (CRP) og 4β-hydroksykolesterol (4β-OH-K) ved baseline (a) og 3 måneder etter oppstart med biologiske DMARDs (b). Lineære trendlinjer er lagt til for å visualisere sammenhengene.



Figur 3.7 Korrelasjon mellom senkningsreaksjon (SR) og serumkonsentrasjon av 4β-hydroksycholesterol (4β-OH-K) ved baseline (a) og 3 måneder etter oppstart med biologiske DMARDs (b). Lineære trendlinjer er lagt til for å visualisere sammenhengene.

4 Diskusjon

Den økte bruken av biologiske legemidler medvirker til at legemiddelinteraksjoner mellom disse og lav-molekylære legemidler er et aktuelt tema. I denne masteroppgaven ble det for første gang undersøkt hvordan behandling med ulike grupper av bDMARDs innvirker på CYP3A-fenotype hos RA-pasienter. I vår studie ble det ikke observert signifikante forskjeller i median serumkonsentrasjon av CYP3A-biomarkøren 4β-OH-K før og 3 måneder etter påbegynt behandling bDMARDs i pasienter med RA. Dette var litt uventet da hypotesen var at oppstart med bDMARDs ville føre til oppregulert aktivitet og ekspresjon av CYP3A, reflektert av høyere serumkonsentrasjoner av 4β-OH-K sammenlignet med før behandlingsstart.

Våre resultater kunne ikke vise at behandling med bDMARDs bedret CYP3A-fenotype hos RA-pasienter i løpet av 3 måneder. Dette er ikke i tråd med en tidligere studie med RA-pasienter publisert av Schmitt *et al.*, der AUC av CYP3A4-substratet simvastatin ble redusert etter behandling med tocilizumab, som er et bDMARD som hemmer IL-6 (45). Det kan være flere årsaker til at resultatene i studiene ikke samsvarer. En mulig forklaring kan være forskjeller mellom RA-pasientenes inflammasjonsstatus i de to studiene. RA er en kronisk inflammatorisk sykdom og som forventet var nivåene av CRP og SR forhøyet ved baseline og ble redusert etter oppstart med bDMARDs. Samtidig var ikke nivåene mye forhøyet i forhold til øvre referanseområde (24). Når man i tillegg tar i betraktning studiepopulasjonens høye kvinneandel og relativt høye alder hadde man forventet høyere baselinenivåer av CRP og SR. På en annen side var ikke RA-pasientene behandlingsnaive og det kan tenkes at baselineverdiene av CRP og SR allerede var redusert som følge av annen antiinflammatorisk behandling. Sammenlignet med studien til Schmitt *et al.* var gjennomsnittlig CRP-konsentrasjon før behandling med tocilizumab ca. 40-50 mg/L (45), dvs. ca. 3-4 ganger høyere enn gjennomsnittskonsentrasjonen av CRP ved baseline i vår studie. Dette er et viktig poeng da annen antiinflammatorisk legemiddelbehandling teoretisk sett også kan ha bedret en inflammasjonsrelatert nedsatt CYP-metabolisme. Likevel kunne ikke korrelasjonsanalysene mellom relativ endring av 4β-OH-K-konsentrasjon og inflammasjonsmarkørene vise at graden av inflammatorisk aktivitet ved baseline var avgjørende for retningen og størrelsen på endringer i 4β-OH-K-konsentrasjon (figur 3.5 og 3.6).

Resultatene rapportert i studien til Schmitt *et al.* er basert på endringer i AUC for simvastatin 1 og 5 uker etter en enkeltdose tocilizumab (45), mens vi i vår studie studerer serumkonsentrasjonsendringer av 4 β -OH-K 3 måneder etter oppstart med bDMARDs. Denne forskjellen i behandlingstid med bDMARDs mellom studiene kan være en mulig forklaring på hvorfor studieresultatene ikke samsvarer. En behandlingstid på 3 måneder anses som tilstrekkelig for å se eventuelle effekter basert på at det ble observert 57 % reduksjon i AUC for simvastatin 1 uke etter behandlingen med tocilizumab (45). Med utgangspunkt i at bDMARDs har generelt lang halveringstid (56), antas det videre at effekten på CYP-ekspresjon/-aktivitet skal vedvare i flere uker etter seponering, og støttes av at AUC for simvastatin fortsatt var redusert 5 uker etter tocilizumab-behandling i studien til Schmitt *et al* (45). På den andre siden er det anslått at 4 β -OH-K har en halveringstid på 17 dager (66), og det kan ikke utelukkes at den lange halveringstiden gjør at det kreves lenger behandlingstid før man ser eventuelle endringer i serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K.

Det kan også tenkes at den observerte reduksjonen i AUC for simvastatin (45) skyldes andre faktorer enn CYP3A, og at disse faktorene ikke innvirker på serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K. Det er for eksempel rapportert at fenotype av legemiddeltransportører, for eksempel P-glykoprotein, også kan påvirkes av inflammasjon (38), og dette, samt tilstrekkelig behandlingstid ved bruk av 4 β -OH-K som biomarkør, vil være viktig og interessant å ta hensyn til i fremtidige studier hvor man undersøker effekten av inflammasjon på metabolisme og farmakokinetikk.

Våre resultater viser stor individuell variasjon i relativ serumkonsentrasjonsendring av 4 β -OH-K som følge av bDMARD-behandling (figur 3.2), men kun hos et fåtall av pasientene viser endringene samme tendens som rapportert tidligere i studien med simvastatin og tocilizumab (45). Det kan være flere årsaker til den store variasjonen i relativ endring av 4 β -OH-K-konsentrasjon. En mulig forklaring kan være forskjeller i biologisk angrepspunkt, og dermed effekt på inflammasjonsprosesser, mellom ulike typer av bDMARDs. TNF α og IL-6 er blant de cytokinene som i *in vitro*-modeller med humane hepatocytter har vist å være potente i nedreguleringen av CYP3A (37), og teoretisk vil man kunne tenke seg at bDMARDs som er TNF α - og IL-6-hemmere vil ha størst «gjenvinnende» effekt på CYP3A-fenotype.

I studien til Schmitt *et al.* ble det rapportert at AUC for simvastatin var redusert med 57 % og 39 % henholdsvis 1 og 5 uker etter behandling med IL-6-hemmeren tocilizumab i 12 RA-pasienter (45). I vår studie var det seks pasienter som startet behandling med tocilizumab, men selv om den relative serumkonsentrasjonsendringen av 4 β -OH-K 3 måneder etter oppstart av behandling viste tendens til økning, var endringen betydelig mindre sammenlignet med de rapporterte endringene i AUC for simvastatin (45). Dette kan muligens forklares av lavt antall tocilizumab-behandlede pasienter i vår studie, men også forskjeller i RA-pasientenes inflammasjonsstatus og behandlingstid mellom studiene kan være mulige forklaringer, som diskutert tidligere. En annen forklaring kan være at tocilizumab påvirker andre prosesser enn CYP3A-metabolisme som har betydning for serumkonsentrasjonen av simvastatin, men som ikke påvirker serumkonsentrasjonen av 4 β -OH-K. Selv om tocilizumab administreres via infusjon eller subkutan injeksjon kan det også tenkes at tocilizumab påvirker CYP-ekspressjon/-aktivitet ulikt i tarmvegg og lever. En mulig forklaring på de ulike studieresultatene kan derfor være at tocilizumab gjenoppretter en dempet CYP-ekspressjon/-aktivitet sterkere i tarmvegg enn i lever, og at 4 β -OH-K bedre reflekterer CYP3A-fenotype i lever enn i tarm, men dette må undersøkes i videre studier.

Videre ble det noe overraskende ikke observert store forskjeller i relativ serumkonsentrasjonsendring av 4 β -OH-K mellom B-cellehemmeren rituximab og de andre bDMARD-gruppene, til tross for at rituximabs virkningsmekanisme ikke involverer modulering av cytokiner (55).

Sammenlignet med kontrollgruppen uten kjent inflammatorisk sykdom, var 4 β -OH-K-konsentrasjonen hos RA-pasientene signifikant lavere både ved baseline og etter 3 måneders bDMARD-behandling. Dette tyder på at kronisk systemisk inflammasjon medfører nedregulert CYP3A-ekspressjon/-aktivitet i RA-pasienter. Denne observasjonen er i overensstemmelse med tidligere studier hvor det er vist at RA-pasienter har høyere serumkonsentrasjoner av CYP3A-metaboliserte legemidler sammenlignet med friske personer (44, 45). Resultatene kan tyde på at pasienter med RA må ha lavere doseringer av CYP3A-metaboliserte legemidler sammenlignet med friske personer uten inflammasjon, men flere studier med et høyere antall observasjoner er nødvendig for å trekke sikre konklusjoner.

Et av målene med denne studien var å undersøke hvordan inflammasjonsmarkørene, CRP og SR, korrelerte med serumkonsentrasjoner av 4β-OH-K. Det er i en tidligere studie med begrenset antall personer rapportert om en negativ sammenheng mellom CRP og 4β-OH-K (75). Våre resultater kunne ikke vise signifikant korrelasjon mellom inflammasjonsmarkørene og 4β-OH-K før behandling, men det ble noe overraskende observert en statistisk signifikant korrelasjon etter 3 måneders bDMARD-behandling. En tilsvarende statistisk signifikant sammenheng mellom CRP og 4β-OH-K ble også observert i kontrollgruppen når levetiracetam-behandlede pasienter med CRP-konsentrasjon >5 mg/L også ble inkludert i korrelasjonsanalysen. Disse statistisk signifikante sammenhengene, observert både etter behandling med bDMARDs og i den utvidede kontrollgruppen, er i tråd med resultatet i den tidligere nevnte studien (75), og støtter ytterligere teorien om at inflammasjon kan nedregulere CYP3A-ekspresjon/-aktivitet.

Den manglende korrelasjonen ved baseline, før oppstart med bDMARDs, kan tyde på at inflammasjonstilstanden overstyrer inflammasjonsmediert endring av CYP-ekspresjon/-aktivitet. Videre kan det tyde på at CRP og SR ikke er egnet til å reflektere inflammasjonstilstand i relasjon til CYP3A-fenotype i RA-pasienter. De noe lave baselinivåene av CRP og SR, som diskutert tidligere, kan være en mulig forklaring på dette. CRP er en av flere kandidater som er foreslått som potensiell biomarkør for endret CYP-fenotype ved inflammasjon (34). Basert på resultatene fra vår studie kan det tenkes at konsentrasjonsmålinger av IL-6, TNFα eller noen av de andre foreslåtte markørene vil være bedre mål på inflammasjonsaktivitet i relasjon til CYP-fenotype.

Kjønn er en ikke-genetisk faktor som er antatt å ha betydning for CYP3A-fenotype, og høyere serumkonsentrasjoner av 4β-OH-K hos kvinner enn menn er tidligere rapportert (65, 68). Våre resultater kunne ikke vise at det var signifikant forskjell i 4β-OH-K-konsentrasjoner mellom kvinner og menn ved baseline, men det ble observert signifikant høyere 4β-OH-K-konsentrasjon hos kvinner etter 3 måneder med behandling. Denne observasjonen samsvarer med resultatene fra korrelasjonsanalysene mellom CRP/SR og 4β-OH-K.

Flere metoder for fenotyping av CYP3A er foreslått, men foreløpig er det ingen endogene biomarkører som benyttes i praksis. I denne studien ble den endogene biomarkøren 4β-OH-K benyttet som mål på CYP3A-fenotype. Valget av 4β-OH-K anses som trygt da det i flere

studier er vist at 4 β -OH-K korrelerer godt med etablerte eksogene biomarkører som midazolam og kinin (70, 72). Videre er studien basert på reanalysering av biobankede serumprøver så administrering av eksogene biomarkører var utelukket. Ulempen ved bruk av 4 β -OH-K er at den lange halveringstiden (66) gjør at biomarkøren er mindre egnet til å fange opp raske endringer i CYP3A-aktivitet, og at varigheten på studiene bør være lenger sammenlignet med studier hvor det blir brukt biomarkører med kortere halveringstid.

I denne studien er datamaterialet basert på biobankede serumprøver. Å innhente data fra register og databaser er forbundet med flere metodologiske ulemper. Informasjon om pasientenes legemiddelbruk i kontrollgruppen ble hentet fra rekvisisjoner, og er en potensiell feilkilde. I forhold til testgruppen er mangel på informasjon om komedisinering i tillegg til bDMARDs en svakhet. Blant annet kan kortikosteroider, en legemiddelgruppe som inngår i den farmakologiske behandlingen av RA, indusere CYP3A (12, 39). Dette kan potensielt ha medvirket til at det ikke ble observert forskjeller i 4 β -OH-K-konsentrasjon etter 3 måneder med bDMARD-behandling.

5 Konklusjon

Denne studien bekrefter at CYP3A-fenotype er redusert hos pasienter med RA sammenlignet med personer uten inflammatorisk sykdom. Behandling med bDMARDs bedrer ikke CYP3A-fenotype hos RA-pasienter i løpet av 3 måneder, men etter påbegynt behandling med bDMARDs er CYP3A-fenotype signifikant korrelert med nivå av inflammasjonsmarkører, i motsetning til før oppstart. Resultatene indikerer at RA-pasienter kan ha behov for ca. 20-30 % lavere doser av CYP3A-metaboliserte legemidler for unngå for høye serumkonsentrasjoner, og dermed bivirkninger og toksisitet. Effekten av inflammasjon på metabolisme og farmakokinetikk av CYP3A-substrater kan imidlertid variere avhengig av farmakokinetiske egenskaper, og det er derfor viktig at kommende studier undersøker og sammenligner betydningen av inflammasjon for serumkonsentrasjonen av ulike CYP3A-legemidler.

Litteraturliste

1. Bank PC, Swen JJ, Guchelaar HJ. Pharmacogenetic biomarkers for predicting drug response. *Expert review of molecular diagnostics*. 2014;14(6):723-35.
2. Rowland M, Tozer T. Chapter 12. Variability. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications* 4ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2011. p. 333-44.
3. Mannesse CK, Derkx FH, de Ridder MA, Man in 't Veld AJ, van der Cammen TJ. Contribution of adverse drug reactions to hospital admission of older patients. Age and ageing. 2000;29(1):35-9.
4. Hopf Y, Watson M, Williams D. Adverse-drug-reaction related admissions to a hospital in Scotland. *Pharmacy world & science : PWS*. 2008;30(6):854-62.
5. Stenberg-Nilsen H, Harg P. Hvorfor melde bivikninger? *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift* 2009(11):12-3.
6. Gonzalez F, Tukey R. Chapter 3. Drug Metabolism. In: Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7 ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2006. p. 71-8.
7. Buxton I. Chapter 1. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination. . In: Brunton L, Lazo J, Parker K, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 7ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2006. p. 10-2.
8. Spigset O, Slordal L. [Basic pharmacokinetics--elimination]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke*. 2005;125(9):1181-2.
9. Rowland M, Tozer T. Chapter 5. Elimination. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications* 4ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2011. p. 111-5.
10. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England journal of medicine*. 2005;352(21):2211-21.
11. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Kapittel 27. Bioanalyse av legemidler. *Legemiddelanalyse*. 2 ed. Bergen: Fagbokforlaget; 2010.
12. Bozina N, Bradamante V, Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 2009;60(2):217-42.
13. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeypigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & therapeutics*. 2007;116(3):496-526.
14. Thummel KE, Lin YS. Sources of interindividual variability. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2014;1113:363-415.
15. Rowland M, Tozer T. Chapter 13. Genetics. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications*. 4 ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2011. p. 357-71.
16. Spigset O. The cytochrome P-450 system. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*. 2001;121(28):3296-8.
17. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2006;34(5):880-6.
18. Ingelman-Sundberg M, Daly A, Nebert D. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database; 2013. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm> (lest: 23.04.2015).

19. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Frontiers in genetics*. 2013;4:12.
20. Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, et al. Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(26):17882-9.
21. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clinical pharmacokinetics*. 2006;45(1):13-31.
22. Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table: Indiana University School of Medicine; 2007. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/clinical-table/> (lest: 26.03.2015).
23. Næss O. Kapittel 3. Betennelse. *Sykdomslære og patologisk anatomi*. 6 ed. Høvik: Forlaget Vett & Viten; 2012. p. 34-9.
24. Klingenberg O. Kapittel 4. Betennelsesmarkører. In: Hagve T, Berg J, editors. *Klinisk biokjemi og fysiologi*. 4 ed. Oslo: Gyldendal Akademisk; 2012. p. 47-50.
25. Crowson C, Rahman M, Matteson E. Which measure of inflammation to use? A comparison of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein measurements from randomized clinical trials of golimumab in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2009;36:1606 - 10.
26. Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2006;46:123-49.
27. Morgan ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;85(4):434-8.
28. Morgan ET, Goralski KB, Piquette-Miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(2):205-16.
29. Chang KC, Bell TD, Lauer BA, Chai H. Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet*. 1978;1(8074):1132-3.
30. Rivory LP, Slaviero KA, Clarke SJ. Hepatic cytochrome P450 3A drug metabolism is reduced in cancer patients who have an acute-phase response. *British journal of cancer*. 2002;87(3):277-80.
31. Lanchote VL, Almeida R, Barral A, Barral-Netto M, Marques MP, Moraes NV, et al. Impact of visceral leishmaniasis and curative chemotherapy on cytochrome P450 activity in Brazilian patients. *British journal of clinical pharmacology*. 2015.
32. Molanaei H, Stenvinkel P, Qureshi AR, Carrero JJ, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Metabolism of alprazolam (a marker of CYP3A4) in hemodialysis patients with persistent inflammation. *European journal of clinical pharmacology*. 2012;68(5):571-7.
33. Shah RR, Smith RL. Inflammation-induced phenoconversion of polymorphic drug metabolizing enzymes: hypothesis with implications for personalized medicine. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2015;43(3):400-10.
34. Harvey RD, Morgan ET. Cancer, inflammation, and therapy: effects on cytochrome p450-mediated drug metabolism and implications for novel immunotherapeutic agents. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;96(4):449-57.
35. Parham P. Chapter 2. Innate Immunity. *The Immun System*. 3 ed: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2009. p. 49-50.
36. Renton KW. Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. *Expert Opinoin on Drug Metabolism & Toxicology*. 2005;1(4):629-40.

37. Aitken AE, Morgan ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals. 2007;35(9):1687-93.
38. Christensen H, Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. Frontiers in Pharmacology. 2012;3.
39. Norsk elektronisk legehåndbok. Revmatoid artritt. <http://www.legehandboka.no/> (lest: 22.02.2015).
40. Shrivastava AK, Pandey A. Inflammation and rheumatoid arthritis. Journal of physiology and biochemistry. 2013;69(2):335-47.
41. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis and rheumatism. 2010;62(9):2569-81.
42. Siemons L, ten Klooster P, Vonkeman H, van Riel P, Glas C, van de Laar M. How age and sex affect the erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in early rheumatoid arthritis. BMC Musculoskeletal Disorders. 2014;15(1):368.
43. Johnsen V, Forre O, Haga HJ, Kvien TK, Mikkelsen K, Nordvag BY, et al. [Combination therapy in rheumatoid arthritis]. Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. 2003;123(11):1511-3.
44. Mayo PR, Skeith K, Russell AS, Jamali F. Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. British journal of clinical pharmacology. 2000;50(6):605-13.
45. Schmitt C, Kuhn B, Zhang X, Kivitz AJ, Grange S. Disease-drug-drug interaction involving tocilizumab and simvastatin in patients with rheumatoid arthritis. Clinical pharmacology and therapeutics. 2011;89(5):735-40.
46. Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, McInnes I. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. Pharmacological reviews. 2015;67(2):280-309.
47. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Remicade. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
48. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Humira. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
49. Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell. Legemiddelkapitler. Golimumab. <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/> (lest: 24.02.2015)
50. Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell. Legemiddelkapitler. Certolizumab. <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/> (lest: 08.03.2015)
51. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Enbrel. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
52. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) RoActemra. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
53. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Kineret. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
54. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) Orencia. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
55. Statens legemiddelverk. Preparatomtale (SPC) MabThera. <http://slv.no/Legemiddelsoek/> (lest: 24.02.2015)
56. Rowland M, Tozer T. Chapter 21. Protein Drugs. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications 4ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business 2011. p. 633-62.

57. Keizer RJ, Huitema AD, Schellens JH, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(8):493-507.
58. Lee JI, Zhang L, Men AY, Kenna LA, Huang SM. CYP-mediated therapeutic protein-drug interactions: clinical findings, proposed mechanisms and regulatory implications. *Clinical pharmacokinetics*. 2010;49(5):295-310.
59. Christensen M, Andersson K, Dalen P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;73(6):517-28.
60. Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):187-216.
61. Ged C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Bories P, et al. The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III_A induction. *British journal of clinical pharmacology*. 1989;28(4):373-87.
62. Galteau MM, Shamsa F. Urinary 6beta-hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *European journal of clinical pharmacology*. 2003;59(10):713-33.
63. Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, et al. Metabolism of 4 beta -hydroxycholesterol in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(35):31534-40.
64. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broome U, Einarsson C, et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(42):38685-9.
65. Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, et al. 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(3):201-8.
66. Diczfalusy U, Kanebratt KP, Bredberg E, Andersson TB, Bottiger Y, Bertilsson L. 4beta-hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin. *British journal of clinical pharmacology*. 2009;67(1):38-43.
67. van de Merbel NC, Bronsema KJ, van Hout MW, Nilsson R, Sillen H. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4beta-hydroxycholesterol in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;55(5):1089-95.
68. Gebeyehu E, Engidawork E, Bijnsdorp A, Aminy A, Diczfalusy U, Aklillu E. Sex and CYP3A5 genotype influence total CYP3A activity: high CYP3A activity and a unique distribution of CYP3A5 variant alleles in Ethiopians. *The pharmacogenomics journal*. 2011;11(2):130-7.
69. Josephson F, Bertilsson L, Bottiger Y, Flamholz L, Gisslen M, Ormaasen V, et al. CYP3A induction and inhibition by different antiretroviral regimens reflected by changes in plasma 4beta-hydroxycholesterol levels. *European journal of clinical pharmacology*. 2008;64(8):775-81.
70. Kanebratt KP, Diczfalusy U, Backstrom T, Sparve E, Bredberg E, Bottiger Y, et al. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;84(5):589-94.
71. Lutjohann D, Marinova M, Schneider B, Oldenburg J, von Bergmann K, Bieber T, et al. 4beta-hydroxycholesterol as a marker of CYP3A4 inhibition in vivo - effects of

itraconazole in man. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;47(12):709-15.

72. Bjorkhem-Bergman L, Backstrom T, Nylen H, Ronquist-Nii Y, Bredberg E, Andersson TB, et al. Comparison of endogenous 4beta-hydroxycholesterol with midazolam as markers for CYP3A4 induction by rifampicin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(8):1488-93.

73. Marde Arrhen Y, Nylen H, Lovgren-Sandblom A, Kanebratt KP, Wide K, Diczfalusy U. A comparison of 4beta-hydroxycholesterol : cholesterol and 6beta-hydroxycortisol : cortisol as markers of CYP3A4 induction. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75(6):1536-40.

74. Dutreix C, Lorenzo S, Wang Y. Comparison of two endogenous biomarkers of CYP3A4 activity in a drug-drug interaction study between midostaurin and rifampicin. *European journal of clinical pharmacology*. 2014;70(8):915-20.

75. Bjorkhem-Bergman L, Nylen H, Norlin AC, Lindh JD, Ekstrom L, Eliasson E, et al. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D and the CYP3A biomarker 4beta-hydroxycholesterol in a high-dose vitamin D supplementation study. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2013;41(4):704-8.